

# Stanovení polyfenolických látek ve vybraných potravinách

Bc. Jitka Michálková

---

Diplomová práce  
2011



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

akademický rok: 2010/2011

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jitka MICHÁLKOVÁ**  
Osobní číslo: **T09582**  
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie a ekonomika výroby tuků, detergentů a kosmetiky**

Téma práce: **Stanovení polyfenolických látek ve vybraných potravinách**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. Rozdělení polyfenolických látek.
2. Výskyt polyfenolů v potravinách.
3. Účinky na zdraví.
4. Možnosti stanovení polyfenolů.

### II. Praktická část

1. Metodika stanovení polyfenolů.
2. Stanovení polyfenolů ve vybraných potravinách.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*, Pavel Klouda, Ostrava 2003.

[2] <http://cs.wikipedia.org/wiki/Polyfenol>.

[3] [http:// med.muni.cz/biochem/seminare/prirantiox.rtf/](http://med.muni.cz/biochem/seminare/prirantiox.rtf/).

[4] <http://www.agronavigator.cz/default.asp?ids=147&ch=13&typ=1&val=55463>.

Vedoucí diplomové práce:

**doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.**

Ústav biochemie a analýzy potravin

Datum zadání diplomové práce:

**25. února 2011**

Termín odevzdání diplomové práce:

**20. května 2011**

Ve Zlíně dne 25. února 2011

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.  
*děkan*



doc. Ing. Rahula Janiš, CSc.  
*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: MICHÁLKOVÁ JIŤKA

Obor: TEVTDK

## 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 15. 5. 2011

Michálková Jitka

<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 nevdělečně 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 nezahnuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užíje-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 užit 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 přihlídně k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

Cílem této práce bylo vyvinout metody stanovení a identifikace polyfenolických látek v potravinách metodou HPLC v kombinaci s ESI - MS. První část této diplomové práce se zabývá klasifikací jednotlivých polyfenolických látek. Jsou zde charakterizovány základní skupiny a jejich nejčastěji se vyskytující zástupci. Následuje kapitola, která je věnována potravinám, v nichž se polyfenoly vyskytují ve významném množství. Dále jsou charakterizovány dvě metody používané při stanovení polyfenolů v potravinách, tj. MS a HPLC. Posledním oddílem je experimentální část. Zde je popsán způsob, jakým bylo postupováno při stanovení vybraných polyfenolických látek metodou HPLC a ESI – MS.

Klíčová slova: Polyfenoly, zdraví, rakovina, antioxidanty, čaj, káva, víno, chmel, ovoce, ESI/MS, HPLC.

## **ABSTRACT**

The aim of this work was to develop methods for identification and determination of polyphenols in foods by HPLC combined with ESI - MS. The first part of this work deals with the classification of polyphenols. They are characterized by a core group and the most frequently occurring representatives. The following chapter is devoted to food, in which the polyphenols found in significant quantities. Next are to be characterized two methods used in the determination of polyphenols in foods, ie. MS and HPLC. The last section is the experimental part. Here is described how they were followed in the determination of selected polyphenols by HPLC and ESI - MS.

Keywords: Polyphenols, health, cancer, antioxidants, tea, coffee, wine, hops, fruit, ESI / MS, HPLC.

Děkuji vedoucímu diplomové práce doc. Ing. Miroslavu Fišerovi, CSc. za odborné vedení a veškerou pomoc, kterou mi poskytl při zpracování této práce. Dále děkuji Ing. Lence Fojtíkové za cenné rady a pomoc při práci v laboratoři.

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

Ve Zlíně 15. května 2011

A handwritten signature in cursive script, reading "Miroslav Fišer". The signature is written in black ink on a light-colored background.

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>11</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>12</b>
<b>1 KLASIFIKACE POLYFENOLŮ</b> .....	<b>13</b>
1.1 ROZDĚLENÍ POLYFENOLŮ .....	13
1.1.2 Dělení podle subkomponent.....	14
1.1.3 Dělení podle počtu uhlíků .....	15
1.1.4 Fenolické kyseliny .....	16
1.1.5 Lignany .....	16
1.1.6 Flavonoidy.....	17
1.1.6.1 Flavonoly .....	18
1.1.6.2 Flavanoly .....	19
1.1.6.3 Proanthokyanidiny .....	19
1.1.6.4 Anthokyanidy.....	20
1.1.6.5 Flavanony.....	21
1.1.6.6 Isoflavonoidy .....	21
1.1.7 Stilbeny .....	21
<b>2 POLYFENOLY V POTRAVINÁCH A JEJICH ÚČINKY NA ZDRAVÍ</b> .....	<b>23</b>
2.1 ZJEDNODUŠENÉ SCHÉMA METABOLISMU POLYFENOLŮ .....	24
2.2 ČAJ .....	24
2.2.1 Katechiny v čaji.....	26
2.2.1.1 Epigallokatechin-3-gallát (EGCG) .....	27
2.3 KÁVA .....	28
2.4 CHMEL, PIVO .....	29
2.4.1 Chemické vlastnosti xanthohumolu (XN) a isoxanthohumolu (IX) .....	31
2.5 RESVERATROL V OVOCI A ZELENINĚ .....	32
2.6 VÍNO .....	34
2.7 POLYFENOLY KAKAA A JEJICH ANTIKARIOGENNÍ ÚČINKY .....	34
2.8 SÝRY .....	35
<b>3 STANOVENÍ POLYFENOLŮ POMOCÍ METODY HPLC</b> .....	<b>36</b>
3.1 INSTRUMENTACE V HPLC .....	37
3.1.1 Čerpadlo .....	37
3.1.2 Směšovací zařízení.....	37
3.1.3 Dávkovací zařízení.....	37
3.1.4 Kolony.....	38
3.1.5 Detektory.....	38
3.2 POPIS HPLC ANALÝZY.....	41
<b>4 STANOVENÍ POLYFENOLŮ POMOCÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE (MS)</b> .....	<b>42</b>



4.1	INSTRUMENTACE MS .....	42
4.1.1	Iontový zdroj .....	43
4.1.1.1	Ionizace elektronem (EI) .....	43
4.1.1.2	Chemická ionizace (CI) .....	44
4.1.1.3	Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) .....	44
4.1.1.4	ESI - MS .....	45
4.1.2	Hmotnostní analyzátor .....	47
4.1.2.1	Kvadrupólový analyzátor .....	48
4.1.2.2	Iontová past .....	48
4.1.3	Detektor .....	49
4.2	ANALÝZA V POZITIVNÍM MÓDU .....	49
4.3	ANALÝZA V NEGATIVNÍM MÓDU .....	50
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>		<b>51</b>
<b>5</b>	<b>METODIKA .....</b>	<b>52</b>
5.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE .....	52
5.2	POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY .....	52
5.3	ANALYZOVANÉ VZORKY .....	53
5.3.1	Sypaný pravý černý čaj (Assam Clasic Blend) .....	53
5.3.2	Sypaný pravý zelený čaj (Ceylon Green Gowrakele) .....	54
5.3.3	Sypaný pravý bílý čaj ( Shou Mei „čaj dlouhověkosti“) .....	55
5.4	METODA HPLC .....	55
5.4.1	Příprava mobilní fáze A a B .....	55
5.4.2	Gradientová eluce .....	56
5.4.3	Stanovení kalibračních křivek pro jednotlivé standardy .....	56
5.4.3.1	Příprava kalibrační řady .....	56
5.4.3.2	Vlastní kalibrace standardů .....	56
5.4.4	Příprava vzorků .....	57
5.4.5	Měření vzorků .....	57
5.5	METODA HPLC/ESI – MS .....	57
5.5.1	HPLC/MS analýza flavonoidů .....	57
5.5.1.1	Fragmentace .....	58
5.5.2	Parametry analýzy .....	58
5.5.3	Stanovení MS spekter standardů .....	59
5.5.4	Stanovení MS spekter vzorků .....	59
5.6	STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT .....	60
<b>6</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>61</b>
6.1	METODA HPLC .....	61
6.1.1	Sestrojení kalibračních křivek pro stanovení vybraných polyfenolů metodou HPLC .....	61
6.1.1.1	Kalibrační křivka pro standard katechin .....	62
6.1.1.2	Kalibrační křivka pro standard theofylin .....	63
6.1.1.3	Kalibrační křivka pro standard rutin .....	64

6.1.1.4	Kalibrační křivka pro standard epigallokatechin (EGC) .....	65
6.1.1.5	Kalibrační křivka pro standard kofein .....	66
6.1.1.6	Kalibrační křivka pro standard kyselina ferulová.....	67
6.1.1.7	Kalibrační křivka pro standard kyselina kumarová .....	68
6.1.1.8	Kalibrační křivka pro standard kyselina sinapová .....	69
6.1.1.9	Kalibrační křivka pro standard kyselina gallová .....	70
6.1.2	Výsledky stanovení polyfenolických látek ve vzorcích čajů .....	71
6.1.2.1	Výsledky měření pro vzorek zeleného čaje .....	71
6.1.2.2	Výsledky měření pro vzorek bílého čaje .....	75
6.1.2.3	Výsledky měření pro vzorek černého čaje.....	78
6.2	METODA HPLC/MS.....	81
6.2.1	Hmotnostní spektra rutinu.....	82
6.2.2	Hmotnostní spektra EC .....	82
6.2.3	Hmotnostní spektra ECG .....	83
6.2.4	Hmotnostní spektra EGC .....	84
6.2.5	Hmotnostní spektra EGCG .....	85
6.2.6	Hmotnostní spektrum katechinu .....	86
6.2.7	Hmotnostní spektrum theofylinu.....	86
6.2.8	Hmotnostní spektrum resveratrolu .....	87
6.2.9	Hmotnostní spektrum kyseliny sinapové .....	87
6.2.10	Hmotnostní spektrum kofeinu .....	88
6.2.11	HPLC/MS analýza vzorku zeleného čaje.....	88
6.2.12	HPLC/MS analýza vzorku bílého čaje .....	92
6.2.13	HPLC/MS analýza vzorku černého čaje .....	94
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>97</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>99</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>104</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>105</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>108</b>

## ÚVOD

Polyfenoly patří mezi nejpočetnější a nejvíce zastoupené sekundární rostlinné metabolity. V současné době jsou polyfenolické látky studovány především v souvislosti s jejich blahodárným vlivem na zdraví člověka. Polyfenoly mají silnou antioxidační aktivitu. Vysoký příjem byl spojen se snížením rizika rakoviny, kardiovaskulárních chorob nebo neurodegenerativních poruch.

Mezi přírodní polyfenoly patří látky jak jednoduché tak i vysoce polymerizované sloučeniny. Hydroxylové skupiny, které obsahují, jsou většinou navázány přímo na fenolovou část molekuly. Navíc bývají polyfenoly často glykosilovány (nejčastěji glukosou) jednou, případně i více sacharidovými jednotkami přes  $\beta$ -glykosidickou hydroxylovou skupinu.

Podrobné studium metabolismu přírodních polyfenolů je instrumentálně náročné a mohlo se začít úspěšně rozvíjet díky využití moderních analytických metod a přístrojů teprve v několika posledních letech.

Spojení kapalinové chromatografie se spektrálními metodami detekce jako je UV-VIS nebo MS umožňuje efektivní spojení pro stanovení polyfenolů. Samotná kapalinová chromatografie je účinná metoda pro rychlé rozdělení směsi, ale tato metoda nestačí pro popis struktury. Ve vysokoúčinné variantě HPLC/UV-VIS/MS je poměrně rychlá metoda pro stanovení polyfenolů a poskytuje i data sloužící k popsání a vysvětlení struktury stanovených látek.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 KLASIFIKACE POLYFENOLŮ

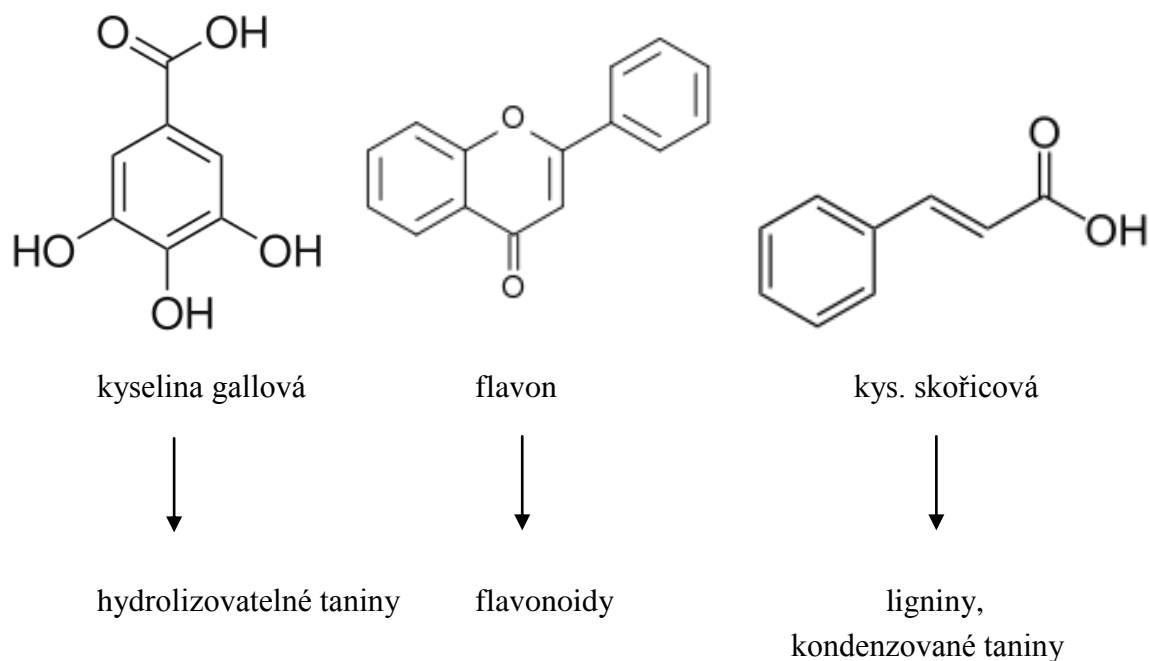
Polyfenoly patří v říši rostlin k hojně zastoupeným látkám. Jsou to různorodé látky, sloužící jako stavební a strukturní složky. Polyfenolům můžeme také přisuzovat chuťové, vonné a barevné vlastnosti květů a plodů, dále také působí jako obranné látky chránící před škůdci a infekcemi.

Polyfenoly jsou skupina chemických sloučenin, které jsou charakterizovány přítomností více než jedné fenolové jednotky. Obsahují jedno nebo více aromatických jader substituovaných hydroxylovými skupinami. Polyfenoly se obecně dělí na hydrolyzovatelné taniny (estery kyseliny gallové a glukózy nebo jiných cukrů) a fenylypropanoidy (například ligniny, flavonoidy a kondenzované taniny) [1].

### 1.1 Rozdělení polyfenolů

Polyfenoly obsahují jedno nebo více aromatických jader substituovaných hydroxylovými skupinami. Rozdělení polyfenolů není jednoduché a často se setkáváme s různými variantami jejich klasifikace. Například je možné klasifikovat polyfenoly podle jednotlivých subkomponent, ze kterých příslušné polymery vznikají. Dále je možné rozdělení podle počtu uhlíků a jejich vazeb nebo také podle počtu aromatických kruhů a jejich vzájemných vazeb.

Na obrázku 1 jsou naznačeny některé základní jednotky a jejich polymery.



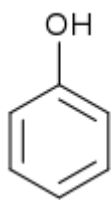
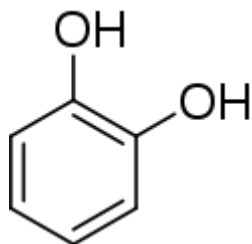
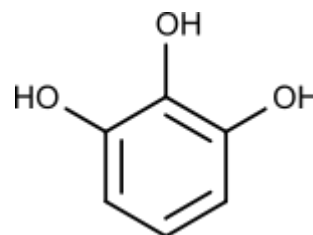
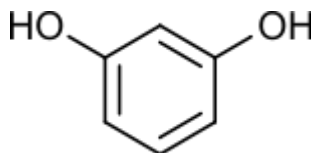
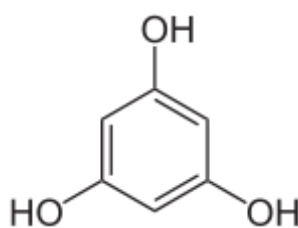
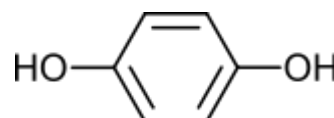
Obr. 1: Základní jednoty a příslušné polymery

### 1.1.2 Dělení podle subkomponent

Polyfenoly se klasifikují také podle typu a počtu přítomných fenolických subkomponent. V daném polyfenolu může být obsažena více než jedna subkomponenta [1].

Tab. 1: Možné fenolické subkomponenty a příklady příslušných polyfenolů [1]

Subkomponenty	Příklady polyfenolů
Fenol	ligniny odvozené od kyseliny kumarové, kampeferol
Pyrokatechol	katechin, quercetin, ligniny odvozené od kyseliny kávové a ferulové,
Pyrogallol	gallokatechiny (EGCG), taniny, myricetin, ligniny odvozené od si-
Resorcinol	resveratrol
Floroglucinol	téměř všechny flavonoidy
Hydrochinon	arbutin

*Fenol**Pyrokatechol**Pyrogallol**Resorcinol**Floroglucinol**Hydrochinon**Obr. 2: Struktury molekul základních subkomponent*

### 1.1.3 Dělení podle počtu uhlíků

Rostlinné polyfenoly lze klasifikovat také podle počtu uhlíků a jejich vzájemných vazeb.

*Tab. 2: Typy fenolických látek podle počtu uhlíků [12]*

Složení	Počet uhlíků	Typy fenolických látek	Příklady
$C_6$	6	Jednoduché fenoly	Katechol
$C_6-C_1$	7	Fenolické kyseliny	Kys. salicylová
$C_6-C_3$	9	Fenylpropanoidy	Chromen
$C_6-C_2-C_6$	14	Stilbeny	Resveratrol
$C_6-C_3-C_6$	15	Flavonoidy	Kvercetin
$(C_6-C_3)_2$	18	Lignany	Yatein
$(C_6-C_3-C_6)_2$	30	Biflavonoidy	Amentoflavon
$(C_6-C_3-C_6)_n$	n	Flavolany	Gallotaniny
$(C_6-C_3)_n$	n	Ligniny	-
$(C_6)_n$	n	Katecholmelaniny	Rostlinné pigmenty

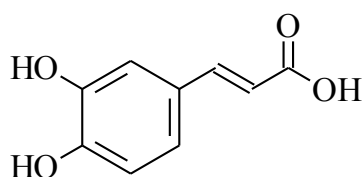
Polyfenolické sloučeniny se mohou dělit také podle počtu aromatických kruhů a způsobu vazby mezi nimi [2]:

- A) Fenolické kyseliny
- B) Lignany
- C) Flavonoidy, které se dále dělí na třídy
- D) Stilbeny

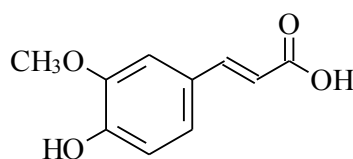
#### 1.1.4 Fenolické kyseliny

Fenolové kyseliny, např. kyselina kávová, ferulová nebo gallová se nejčastěji nacházejí v rostlinách ve formě esterů, v nichž se váží karboxylem na hydroxylové skupiny organických kyselin nebo sacharidů. Nejběžnější látkou tohoto typu je kyselina chlorogenová, tedy 5-kofeylchinová kyselina [3].

Fenolické kyseliny jsou přítomné v řadě potravin. Podle současných poznatků tvoří přibližně jednu třetinu polyfenolů v potravě. V naší stravě jsou fenolické kyseliny zastoupeny především hydroxyskořicovými kyselinami. Nejčastěji je to kyselina kávová a její estery, dále pak kyselina ferulová. Další fenolické deriváty patřící do této skupiny jsou kondenzované taniny. Fenolické kyseliny jsou v nich esterifikovány polyhydroxysloučeninami, nejčastěji glukosou [4].



Obr. 3: Kyselina kávová



Obr. 4: Kyselina ferulová

#### 1.1.5 Lignany

Lignany tvoří jednu z bohatě zastoupených, biogeneticky příbuzných a charakteristických skupin fenyylpropanoidů. Lignany jsou striktně definovány jako dimery vzniklé oxidativní dimerizací dvou fenyylpropanových jednotek spojených centrálními uhlíky jejich propanových bočních řetězců v polohách C-8 a C-8'. Propojením dalších vazeb C-C a C-O, za spo-



luúčasti propanových částí molekuly v různém oxidačním stupni, vznikají všechny možné strukturní typy a formy lignanů [5].

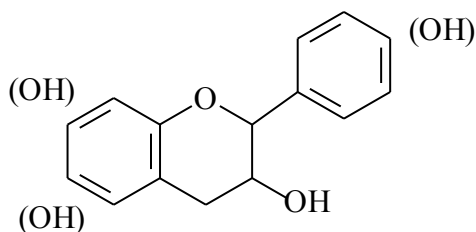
### 1.1.6 Flavonoidy

V současné době je známo více než 6 400 různých flavonoidů vyskytujících se v rostlinné říši. Jejich základní strukturu tvoří flavanové jádro nebo 2-fenyl-benzo- $\gamma$ -pyren. Tato struktura je charakteristická pro 3-deoxyflavonoidy (flavony, flavanony, isoflavony a neoflavony) a 3-hydroxyflavonoidy (flavanoly, antokyaniny, flavanoly). Flavonoidy se nejčastěji vyskytují ve formě glykosidů. Tato forma jim umožňuje vyšší rozpustnost v běžných fyziologických podmínkách a zároveň snižuje jejich reaktivitu a zabezpečuje lepší stabilitu. Navíc glykosidy flavonoidů nejsou substrátem pro polyfenoloxidázu, a proto nepodléhají tzv. enzymovému hnědnutí. Glykosidovou částí flavonoidů bývá obvykle glukóza, galaktóza, xylóza a arabinóza.

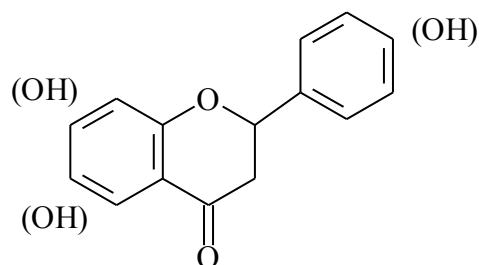
Flavonoidy jsou přítomné přibližně v 80 % vyšších rostlin. Protože jejich biosyntéza je stimulována světlem, nacházejí se ve vnějších obalových pletivech [6].

Flavonoidy jsou deriváty fenylchromanu. Podle toho, kde je fenylová skupina na chromanu navázána, rozlišujeme flavan, isoflavan a neoflavan. Nejčastěji se vyskytují deriváty flavanu, isoflavany jsou méně časté, neoflavany jsou celkem vzácné. Deriváty flavanu se dělí na několik skupin podle oxidace pyranového kruhu. Rozlišujeme flavony, obsahující jen ketoskupinu, flavanoly, které obsahují kromě ketoskupiny ještě tři hydroxyskupiny, a flavanony, které obsahují hydroxyskupiny jen dvě [7].

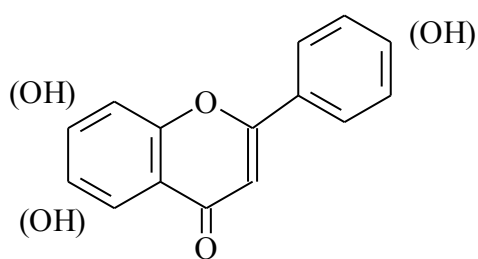
Mezi hlavní skupiny flavonoidů ve výživě člověka patří flavanoly, flavanony, flavony flavonoly, proantokyanidiny, kyanidiny a izoflavonoidy [2].



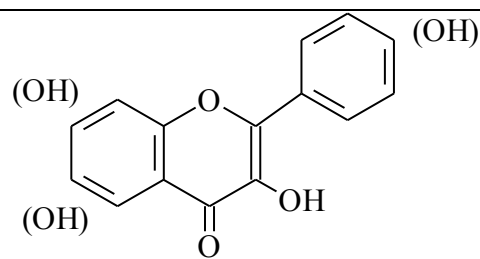
Obr. 5: Flavanoly



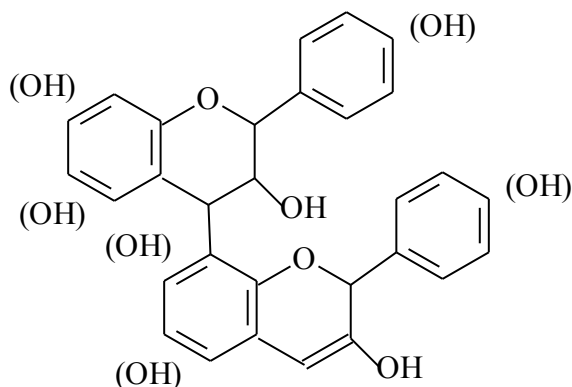
Obr. 6: Flavanony



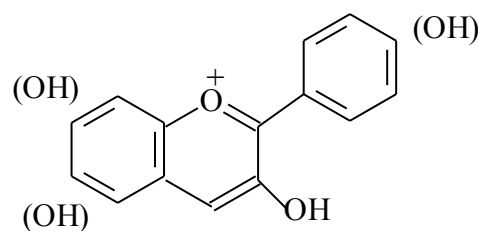
Flavony



Flavonoly



Proantokyanidiny



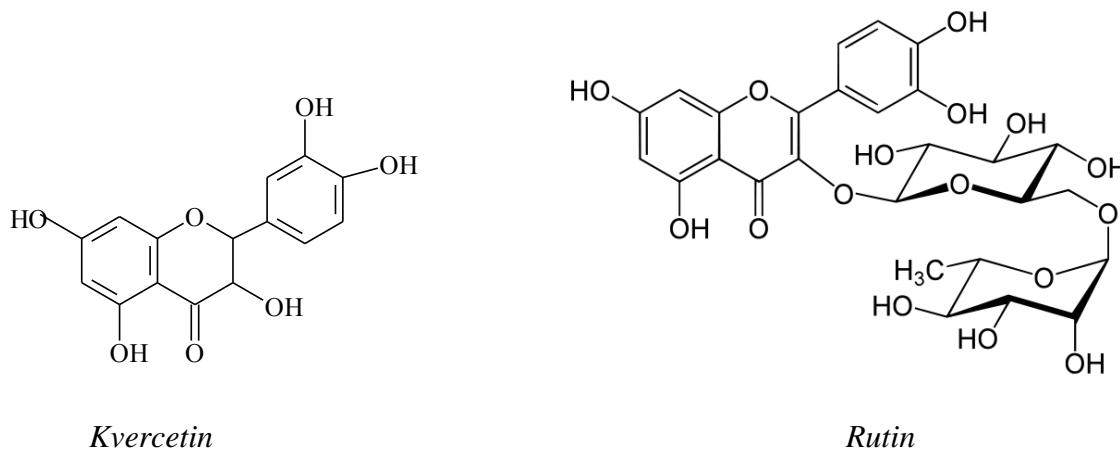
Antokyanidiny

Obr. 7: Struktury molekul vybraných zástupců flavonoidů

### 1.1.6.1 Flavonoly

Dominantní flavonoid ve výživě člověka je flavonol kvercetin. Nachází jednak ve formě volné, jednak vázán s cukernými jednotkami, např. jako kvercetin-3-O-glukosid, kvercetin-4'-O-glukosid, kvercetin-3-O-rhamnosid. Kvercetin se vyskytuje ve vysokých koncentracích v běžně přijímaných potravinách jako cibule ( $300 \text{ mg.kg}^{-1}$  čerstvé váhy), jablka ( $21 - 72 \text{ mg.kg}^{-1}$ ), kapusta ( $100 \text{ mg.kg}^{-1}$ ), červené víno ( $4 - 16 \text{ mg.l}^{-1}$ ), zelený a černý čaj ( $10 - 25 \text{ mg.l}^{-1}$ ) [4, 8].

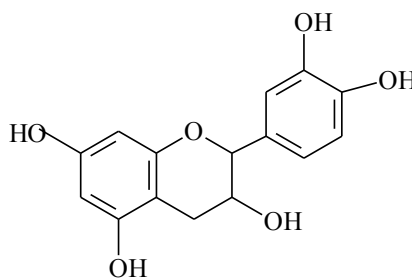
Rutin (kvercetin-3-O-rhamnoglukosid) je součástí léků používaných jako venofarmaka. Má řadu pozitivních zdravotních účinků, mezi jeho největší přínosy patří především schopnost léčit křehkost krevních kapilár a zvyšovat pružnost cév. Snižuje LDL cholesterol. Také je významná jeho antioxidační aktivita a s tím související antikarcinogenní účinky a schopnost zhaset volné radikály. Zesiluje účinek vitamínu C [4, 8].



Obr. 8: Struktury molekul kvercetinu a rutinu

### 1.1.6.2 Flavanoly

Flavanoly můžeme nalézt buď jako monomery nebo polymery. Mezi jejich typické zástupce patří např. katechin, epikatechin (EC), epigallokatechin (EGC) a jejich estery s kyselinou gallovou. Jsou hlavně přítomné v čaji. V černém čaji je obsah redukován asi na polovinu v důsledku oxidace na komplexnější polyfenoly během fermentace. Další zdroje jsou červené víno a čokoláda [4].

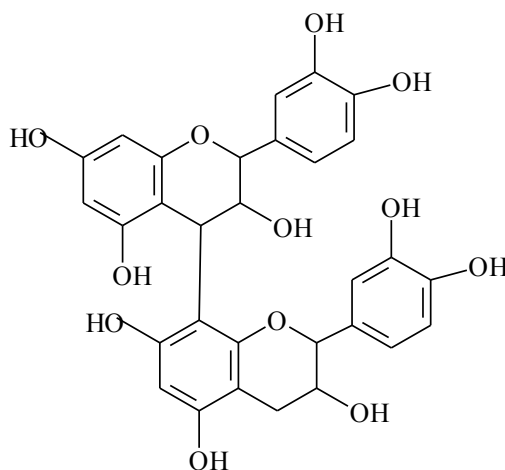


Obr. 9: Katechin

### 1.1.6.3 Proanthokyanidiny

Proanthokyanidiny jsou polymerní flavanoly. Jsou přítomny v rostlinách jako komplexní směsi polymerů. Vyskytují se také vázány esterově s kyselinou gallovou nebo ve formě

dvojitě spojených dimerů. Jejich struktura je velmi složitá, ale přesto v poslední době dochází ve výzkumu těchto látek k strmému rozvoji v souvislosti se zdokonalováním separačních a identifikačních metod [4].



Obr. 10: Proanthokyanidin

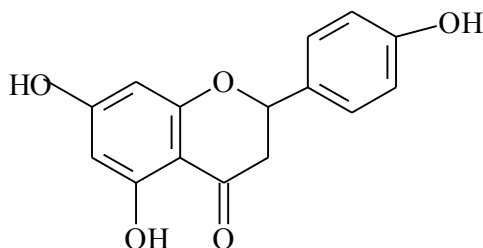
#### 1.1.6.4 Anthokyanidy

Anthokyanidy jsou blízké deriváty flavonolu, avšak obsahují místo karbonylové skupiny – CO– oxoniovou skupinu [9].

V rostlinách se nacházejí jako barviva, pro která je charakteristická červená, modrofialová až modrá barva květů, listů a plodů např. v třešních, švestkách, rybízu. Obsah kolísá v rozmezí 0,15 – 4,5 mg.g<sup>-1</sup> čerstvého ovoce. Průměrný obsah ve vínu se udává 26 mg.l<sup>-1</sup> [4].

### 1.1.6.5 Flavanony

Flavanony jsou také nazývány „citrusové“ flavonoidy. Jsou to látky typicky se vyskytující v pomerančích a grapefruitech. K hlavním se řadí hesperetin, naringenin a eriodictyol [4].

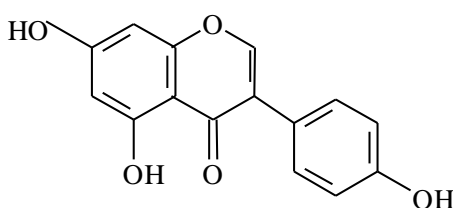


Obr. 11: Hesperetin

### 1.1.6.6 Isoflavonoidy

Nachází se hlavně v luštěninách, vydatným zdrojem je soja (1 - 3 mg.g<sup>-1</sup>) a veškeré produkty z ní. Mezi isoflavonoidy patří především isoflavony daidzein a genistein [4].

Isoflavonoidy jsou fytoalexiny typické pro určité druhy vikvovitých rostlin, kde se účastní chemických interakcí mezi rostlinou a jejími symbionty nebo patogeny. V organismu živočichů konzumujících rostlinnou stravu působí isoflavonoidy jako antioxidanty, ovlivňují metabolismus steroidů a funkci estrogenního receptoru. Některé isoflavony a jejich deriváty mohou vykazovat i toxické účinky [4,10].



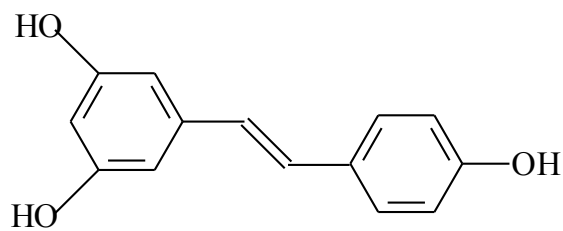
Obr. 12: Genistein

### 1.1.7 Stilbeny

K dietárním polyfenolům se řadí dále stilbeny. Nejsou v rostlinné říši příliš rozšířeny. Nejznámější látkou této skupiny je resveratrol.

Stilbeny jsou známy svým pozitivním vlivem na organismus. Některé stilbeny mají antimikrobiální účinky. Právě kvůli těmto svým vlastnostem mohou být zařazeny mezi fytoalexiny. Což jsou nízkomolekulární antimikrobiální látky, které bývají syntetizovány a akumulovány v rostlinách po napadení mikroorganismy a slouží rostlinám jako aktivní obranné látky [4,11].

Resveratrol se nachází v desítkách druhů rostlin. Nejvíce je obsažen v bobulích révy vinné, dále pak v řadě druhů zeleniny a ořechách. V menším množství se vyskytuje i ve víně. Jeden litr červeného vína obsahuje cca 2 – 6 mg resveratrolu [12].



*Obr. 13: Resveratrol*

## 2 POLYFENOLY V POTRAVINÁCH A JEJICH ÚČINKY NA ZDRAVÍ

Neustále probíhající výzkum polyfenolických látek umožnil zpřesnit znalosti chemické struktury a koncentrací těchto látek v potravě a potvrdil jejich jiné než antioxidační účinky. Některé z nich, zejména blokování iniciační a progresní fáze karcinogeneze, jsou využívány ve výzkumu rakoviny a slibují využití nejen v prevenci, ale i v terapii této choroby. Epidemiologický výzkum těchto látek potvrzuje nezbytnost konzumovat denně 400 g ovoce a zeleniny. Tím se umožňuje dostatečný příjem fenolických látek (100 mg denně a více). Dále bylo zjištěno, že tyto sloučeniny v nativním stavu přítomné ve formě glykosidů jsou v lidském organismu podrobeny částečné deglykosidaci, aktivnímu i pasivnímu transportu do krevního oběhu, biotransformacím v játrech a vylučování ve formě svých metabolitů a jejich konjugátů. Rostlinné fenolické látky zvyšují biologickou hodnotu potravin, ve kterých se vyskytují. Příjem těchto sloučenin v potravě a zejména spotřeba potravin, které jsou jejich zdrojem, tj. ovoce, zeleniny, cereálií, luštěnin a brambor by se v naší společnosti měl významně zvýšit [13].

Biologická aktivita těchto přírodních látek byla opakovaně potvrzena zejména v oblasti indukce biotransformačních enzymů, inhibice přeměny prekarcinogenů na karcinogeny in vivo, antioxidační aktivity aj. Středem pozornosti vědeckého výzkumu zůstávají i nadále skupiny flavonoidů, rostlinných fenolů a fenolických kyselin, rostlinných polyfenolů s polymerovanou nebo polykondenzovanou strukturou a také některých fytochemických faktorů nefenolové povahy.

V tabulce 3 je uvedeno několik příkladů celkového obsahu fenolických látek v potravinách. Nové separační a identifikační metody uplatňované při analýze potravin umožňují získávat kvalifikovanější údaje o obsahu fenolických látek.

Podle doporučení Světové zdravotnické organizace by průměrný denní příjem měl být 3 porce zeleniny (přibližně 250 g) a 2 porce ovoce (150 g). V České republice, podobně jako v celé polovině ostatních evropských států, je spotřeba ovoce a zeleniny hluboko pod touto dávkou (v ČR méně než 200 kg/osoba/rok) [13].

Řada studií prokázala, že strava výrazně ovlivňuje možnosti vzniku rakoviny. V řadě druhů zeleniny a ovoce byly identifikovány konkrétní látky s ochranným působením proti rakovině. Podle odborníků lze definovat složky, které blokují jednotlivé stupně v procesu vzniku

ku rakoviny. Poslední dobou se soustřeďuje pozornost na polyfenoly a další látky obsažené také v čaji [14].

Tab. 3: Obsah flavonoidů v některých druzích ovoce a nápojů ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) [13]

	<b>Myricetin</b>	<b>Kvercetin</b>	<b>Kaempferol</b>	<b>Luteolin</b>	<b>Apigenin</b>
Jablka	0,1	2,0-3,5	0,2	0,1	0,2
Jablečná šťáva	0,05	0,3	0,1	0,05	0,1
Červené víno	0,9	1,1	0,1	0,05	0,1
Černý čaj	0,3	1,5	1,5	0,05	0,1

## 2.1 Zjednodušené schéma metabolismu polyfenolů

**Perorální příjem** → **žaludek** (částečná absorpce glykosidů) → **tenké střevo** (částečná hydrolyza glykosidů glykosylázami a odštěpení alkylových skupin esterázami, částečné vstřebání aglykonů a glykosidů, částečná exkrece polyfenolů zpět do lumen) → **tlusté střevo** (dokončení deglykosylace, změna struktury aglykonů účinkem střevních bakterií, vznik jednoduchých fenolických kyselin, částečné vyloučení glykosidů, aglykonů a jejich metabolitů, částečné zpětné vstřebání těchto látek do enterohepálního oběhu) → **játra** (hlavní část biotransformací, tj. hydroxylace, methylace; vyloučení metabolitů žlučí do stolice a vyloučení ledvinami, zčásti reabsorpce) [13, 15].

## 2.2 Čaj

V Číně byl čaj po tisíciletí používán jako léčivý nápoj. Jeho rodnou zemí, kde se s pěstováním začalo asi před 4000 lety je právě Čína. Nyní je pěstován ve velkých oblastech Asie, Afriky a Latinské Ameriky. Čaj je na základě výrobního procesu klasifikován do tří typů: zelený čaj, čaj oolong a černý čaj. Všechny tyto čaje se připravují z listů *Camellia sinensis* a jeho odrůd. Zelený čaj se připravuje z čerstvých čajových lístků, které jsou sušeny na pánvi, nebo napařovány v páře. Dochází k inaktivaci enzymů, a tudíž čaj neprochází oxidací. Černý čaj je připraven drcením uschlých čajových lístků, které jsou úplně zoxidovány (fermentovány). V průběhu fermentačního procesu složek listů, vznikají četné druhotné produkty, které přispívají charakteristickou barvou a aroma černého čaje. Čaj oolong je částečně zkvašený [16, 17].



Čaj se vyznačuje přítomností polyfenolických látek zvaných katechiny: epigalokatechiny-3-gallát (EGCG), epigalokatechiny (EGC), epicatechin-3-gallát (ECG), a epicatechin (EC). Čajové katechiny jsou hlavními prvky zejména v čerstvých čajových lístcích. Tyto složky jsou oxidované během fermentace [16].

Pití čaje, zejména zeleného čaje, je spojováno s nižším výskytem rakoviny. Například v jedné z japonských studií se efekt pití čaje projevil při denní spotřebě více než 10 šálků. V západních zemích se průměrně jedné z deseti žen vyvine rakovina prsu, zatímco v Japonsku, kde pití zeleného čaje je nedílnou součástí kultury a životního stylu, se karcinom prsu objeví pouze u jedné ze čtyřiceti žen. Nejvýznamnější z tohoto hlediska jsou katechiny. Jejich obsah je v zeleném čaji relativně vysoký, zatímco v černém čaji při procesu fermentace dochází k jejich oxidaci a zničení. Z tohoto důvodu je ochranný potenciál zeleného čaje mnohem vyšší. Obsah polyfenolů v čaji je přímo úměrný množství čajových lístků a době vaření. Antioxidační působení polyfenolů se považuje za prokázané - antioxidační látky obsažené v zeleném čaji jsou schopné účinně zneškodňovat kyslíkové radikály, a tím snižovat oxidativní poškození buněk. Polyfenoly také blokují enzymy, které aktivují přeměnu prokancerogenů na kancerogenní látky. Polyfenoly čaje ovlivňují i úvodní fázi kancerogenního procesu. Zabraňují zhoubnému množení buněk a podporují mezibuněčnou komunikaci. Epigallocatechin gallát (EGCG), nejhojnější složka polyfenolů zeleného čaje, byl prohlášen za aktivní látku v prevenci rakoviny tím, že potlačuje aktivitu urokinasy, a urychluje apoptózu nádorových buněk, zatímco zdravé buňky jsou nepoškozeny.

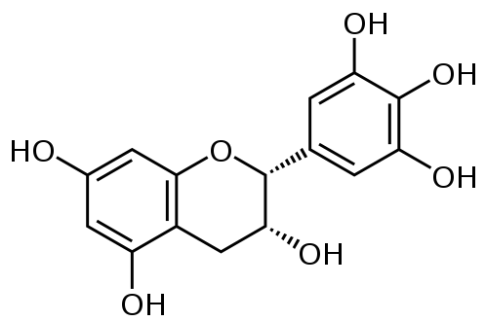
Účinek polyfenolů ze zeleného čaje však mohou negativně ovlivňovat některé přísady. Klasickým příkladem je mléko, které na sebe polyfenoly váže, a tak zabraňuje jejich vstřebávání do organismu. Kromě antikancerogenního působení zmiňme ještě stručně výsledky studií zaměřených na jiné choroby. Studiemi byl prokázán vliv pití čaje na snížení rizika kardiovaskulárních onemocnění, související s ochranou před vznikem aterosklerózy. Tento vliv souvisí opět s antioxidačním mechanismem. Dále se udává snížení výskytu osteoporózy, baktericidní účinky a zlepšení poznávacích a psychomotorických schopností [14, 18].

Obr. 14: Čaj (*Camellia sinensis*)

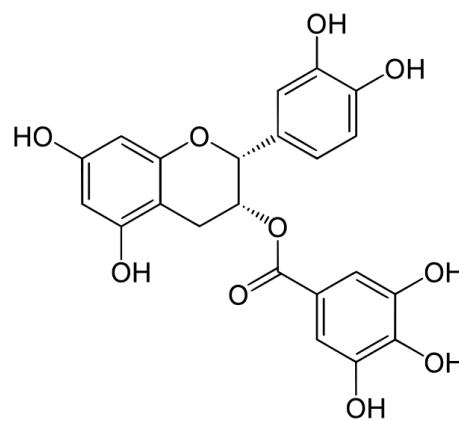
### 2.2.1 Katechiny v čaji

Katechiny jsou látky složením podobné flavonoidům, které jsou ve vyšších rostlinách značně rozšířeny. Za základní stavební jednotky této široké skupiny lze pokládat čtyři jednoduché látky: katechin (C), epikatechin (EC), gallokatechin (GC) a epigallokatechin (EGC). Jednotlivé molekuly se spojují a dochází tak ke vzniku oligomerních a polymerních kondenzátů, z nichž velká většina je biologicky účinná zejména jako antioxidanty, zhášedce volných kyslíkových radikálů, protektory cévní stěny, střevní sliznice, jaterních funkcí, atd.

V současné době jsou tyto látky komerčně získávány ve velkých množstvích a jejich dosažitelnost není problémová. Z hlediska xenobiotické zátěže organismu a jejich toxicity jsou tyto látky prakticky nejedovaté (jejich toxicita je na úrovni kuchyňské soli, většinou ještě nižší) [14].



Obr. 15: Epigallocatechin (EGC)



Obr. 16: Epicatechin gallát (ECG)

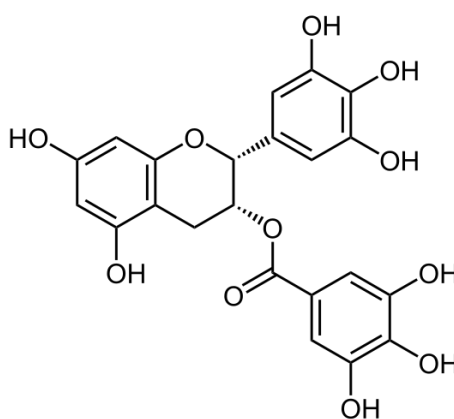
### 2.2.1.1 Epigallokatechin-3-gallát (EGCG)

Je to nejrozšířenější katechin v zeleném čaji. Mnoho studií na zvířatech ukázalo, že EGCG inhibuje karcinogeny kůže, plic, ústní dutiny, jícnu, střeva, tlustého střeva, prostaty a jiných orgánů.

Četné potenciální mechanismy inhibice karcinogenů byly navrženy na základě experimentů s lidskými nádorovými buňkami včetně antioxidační aktivity, inhibice epidermálního růstového faktoru, inhibice proteazomu, a další. Většina z těchto vlivů vyžaduje koncentraci EGCG 1 až 100 mmol.l<sup>-1</sup> [19].

Chronické působení slunečního UV záření na savčí kůži vyvolává řadu biologických reakcí, včetně erytém, edém, spálení sluncem, hyperplastická reakce a rozvoj rakoviny kůže. UV záření, a to zejména UVB (290 - 320 nm), je příčinou vzniku volných radikálů a související reaktivních forem kyslíku, které přispívají ke karcinogenezi. Vzhledem k tomu, že UV záření vyvolává oxidační nežádoucí účinky v kůži, je pravidelný příjem antioxidantů v potravě nebo ošetření pokožky krémy a pleťové vody s obsahem antioxidačních složek vhodná preventivní strategie proti mutagením a karcinogením účinkům UV záření.

Při výzkumu preventivních účinků zeleného čaje proti UV záření, bylo prokázáno, že může zabránit vzniku kožních nádorů. Ve snaze demonstrovat antikarcinogenní mechanismus působení zeleného čaje proti UVB záření, bylo zjištěno, že lokální aplikace zeleného čaje na myši kůže chrání před vylučováním antioxidačních enzymů indukovaných UVB zářením [20].



Obr. 17: Epigallocatechin gallát (EGCG)

## 2.3 Káva

Káva je obvykle horký nápoj z plodu kávovníku. Označuje také prášek získávaný mletím pražených plodů (bobulí) kávovníku, který se k výrobě nápoje používá. Káva je jednou z hlavních komodit světové ekonomiky, je na druhém místě hned za ropou. Nejčastěji pěstované druhy jsou *Coffea arabica* a *Coffea canephora*. *C. Arabica* je stálezelený keř původem z Etiopie. Všechny pěstované *C. arabica* šířící se napříč kontinenty ukazují pozoruhodnou genetickou stejnorodost, která se obzvlášť projevuje citlivostí na škůdce. Rostlina se využívá i k některým lékařským účelům, např. proti respiračním potížím, nebo při léčení žloutenky či malárie, a také k potlačení bolesti [16, 21, 22].

Nápoje připravené z pražených bobů mají příjemnou chuť a aroma a kromě toho vykazují i fyziologické účinky v těle člověka.

Nedávné vědecké studie prokázali pozitivní vliv kávy na lidské zdraví. Studie přinesli málo důkazů o zdravotních rizicích spojených s pitím kávy, na druhou stranu byly potvrzeny zdravotní přínosy spojené s mírnou konzumací kávy dospělou osobou. Nápoj je zdrojem antioxidantů, jako je kofein, kyselina chlorogenová, nebo hydroxyskořicové kyseliny. V porovnání s jinými nápoji káva vyniká svou antioxidační aktivitou (a.a.). Některé studie uvádějí větší a.a. pro rozpustnou kávu a espresso, než pro červené víno a zelený čaj. A.a. je také ovlivněna složením zelených kávových zrn a způsobem jejich zpracování. Pokles a.a. souvisí s mírou pražení, která ovlivňuje především degradaci kyseliny chlorogenové. [22].

Kávě je připisován antibakteriální účinek proti *Streptococcus mutans*, což je kariogenní bakterie. Studie provedená na univerzitě v Rio de Janeiro zkoumala účinek kávových výluhlů u *Coffea arabica* a *Coffea canephora* (robusta) včetně vlivu míry pražení a různého obsahu kofeinu. Byly zjišťovány koncentrace, při nichž se růst bakterií zastaví. Bakteriostatický účinek vykazovala kyselina 5-kofoylchinová, trigonelin, a kyselina kávová při koncentraci 0,8 mg.ml<sup>-1</sup>. Světlejší extrakty z méně pražené kávy působí proti bakteriím silněji než z více pražené kávy. Baktericidně účinná je zřejmě kombinace kyseliny chlorogenové, trigonelinu a kofeinu, které se však při dekofeinování odstraňují [23].



Obr. 18: Arabská káva (*Coffea arabica*)

## 2.4 Chmel, pivo

Pivo je oblíbený slabě alkoholický nápoj, který je pro svůj osvěžující charakter a příjemnou hořkou chuť velmi rozšířen u nás i v zahraničí. Jeho obliba se projevuje v celosvětovém růstu výroby. Jedním z hlavních problémů pivovarského průmyslu je zajištění dostatečně vysoké trvanlivosti piva. Současný trend směřuje k prodeji piva v lahvích a plechovkách, což je důsledek změny životního stylu a extenzivnějšího exportu. Všeobecně se dnes požaduje až roční garantovaná trvanlivost. Vysoká trvanlivost piva neznamena pouze zachování čirosti, která je dnes samozřejmým požadavkem, ale také udržení všech ostatních kvalitativních vlastností, jako je chuť, vůně, barva a pěnivost, a to během transportu i při následném skladování. Bohužel ani sebelepší systém výroby a kontroly nedokáže jednoznačně zaručit, že finální výrobek bude mít dobrou sensorickou stabilitu. Jedny ze složek, které mají těsný vztah k popsaným kvalitativním znakům a stabilitě piva, jsou polyfenolické látky. Do piva se dostávají z ječmene, resp. sladu, chmele a chmelových výrobků jako přírodní složky, které dalekosáhle ovlivňují jeho sensorické vlastnosti i celkovou trvanlivost. Polyfenolické látky se obecně podílejí na chemickofyzikální stabilitě piva, na formování pěny a na odolnosti proti stárnutí a oxidaci piva.

Senzorické stárnutí piva je způsobeno oxidativními změnami. Karbonylové látky staré chuti jsou tvořeny v řetězci radikálových reakcí, kde vznikají působením aktivních forem kyslíku na některé látky, jako jsou mastné kyseliny, aminokyseliny, vyšší alkoholy a sachari-

dy. Průběh reakcí závisí na redukčním potenciálu reagujících látek v řetězci reakcí, některé polyfenoly mohou proto v některých reakcích být i prooxidanty [24, 25, 26].

Navíc polyfenoly mají silné antioxidační, antikarcinogenní, protimikrobiální, protitrombózní a další vlastnosti, které pozitivně působí na lidské zdraví. Z celkového množství polyfenolů obsažených v mladině jich pouze 20 a. 30 % pochází z chmele, ostatní pochází ze sladu [24, 25, 26].

Z chmele se dostávají do piva prenylované flavonoidy s prenylovým substituentem. Více než 80% z nich tvoří xanthohumol (X), který přechází do piva v isomerované formě jako isoxanthohumol (IX) [24].

Prenylflavonoidy se díky pozoruhodným bioaktivním účinkům staly v posledních letech předmětem lékařského a farmaceutického výzkumu. Nejdůležitějším prenylflavonoidem chmele je xanthohumol (X). Z dalších zástupců se ve chmelu nachází desmethylxanthohumol (DMX), isoxanthohumol (IX) a 8-prenylnaringenin (8-PN). Taxonomicky patří prenylflavonoidy mezi polyfenoly chalkonové řady. Prakticky tvoří přechod mezi chmelovými pryskyřicemi a polyfenoly. Společně s pryskyřicemi a silicemi se tvoří v lupulinových žlázách. Tato skutečnost se využívá při jejich analytickém stanovení.

Prenylflavonoidy vstupují do biochemických reakcí odbourávání řady xenobiotik a napomáhají k jejich odstraňování z organismu. Xanthohumol inhibuje některé typy rakovinného bujení, má antimikrobiální, protizánětlivé a antioxidační účinky. Chemopreventivní účinek xanthohumolu při karcinogenezi většinou spočívá v inhibici metabolické aktivace prokarcinogenů nebo inhibici růstu nádorů v raném stadiu. Xanthohumol společně s některými složkami chmelových pryskyřic také působí inhibičně při vzniku osteoporózy. Bioaktivní účinky isoxanthohumolu jsou obdobné jako u xanthohumolu, ale slabší. Nižší účinnost je do určité míry kompenzována vyššími koncentracemi a snadnou dostupností v pivu. Xanthohumol byl dlouhá léta považován za zdroj estrogenních účinků chmele. Na základě rozsáhlých biotestů frakcionovaných chmelových extraktů však byl identifikován jako původce estrogenních účinků chmele 8-prenylnaringenin (8-PN). 8-Prenyl-naringenin je v současné době považován za jeden z nejúčinnějších fytoestrogenů. Obsah a složení chmelových prenylflavonoidů závisí na odrůdě, zralosti chmele, skladovacích podmínkách a způsobu zpracování po sklizni. V běžných pivech jsou koncentrace 8-PN velmi nízké ( $< 50 \text{ g.l}^{-1}$ ) [27, 28].

Analytické stanovení chmelových prenylflavonoidů se provádí kapalinovou chromatografií ve spojení s UV nebo hmotnostním detektorem. Ke stanovení xanthohumolu a DMX ve chmelu a isoxanthohumolu v pivu postačuje UV detektor. Ke stanovení minoritních prenylflavonoidů je nezbytné použití hmotnostního detektoru (LC/MS).

Rozhodujícím faktorem určujícím hladinu prenylflavonoidů v pivu je chmelení, tj. časové rozvržení přídavků chmele, výběr odrůd a chmelových výrobků. Pokud se ke chmelení použijí chmelové extrakty na bázi oxidu uhličitého, pak obsah prenylflavonoidů v pivu je zanedbatelný. Ležácká piva, chmelená zpravidla menším podílem extraktů, obsahují více isoxanthohumolu než piva výčepní. Je známo, že v průběhu výroby piva dochází ke značným ztrátám prenylflavonoidů. Sledování obsahu isoxanthohumolu v meziproduktech a konečném pivu ve dvou českých pivovarech prokázalo, že k největším ztrátám dochází při chlazení mladiny, kvašení a filtraci piva [27].

Díky pozitivním účinkům na lidské zdraví se logicky objevily snahy podstatně zvýšit koncentrace xanthohumolu a isoxanthohumolu v pivech. Toho lze dosáhnout pouze technologickými úpravami a použitím preparátů obohacených xanthohumolem. První piva s vyšším obsahem xanthohumolu, tj. nad  $1 \text{ mg.l}^{-1}$ , byla uvedena na trh v Německu. Při jejich výrobě byla použita tzv. technologie spočívající v aplikaci extraktů obohacených xanthohumolem, přidávaných ke konci chmelovaru [19, 28].

*Tab. 4: Obsah xanthohumolu(XN), desmethylxanthohumolu(DMX) v českých chmelech [27]*

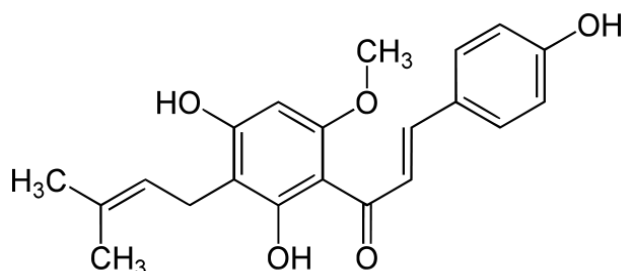
Odrůda	X (%)	DMX (%)
Bor	0,40 - 0,60	0,05 - 0,10
Sládek	0,45 - 0,80	0,10 - 0,25
Premiant	0,30 - 0,50	0,05 - 0,11
Agnus	0,70 - 1,10	0,10 - 0,20

#### 2.4.1 Chemické vlastnosti xanthohumolu (XN) a isoxanthohumolu (IX)

XN je žluto-oranžová krystalická látka nepolární povahy obsažená spolu s chmelovými pryskyřicemi a silicemi v chmelových hlávkách všech chmelových odrůd. Je to látka, která patří mezi chalkony a prenylované flavonoidy. Její povahou je možné ji řadit mezi polyfe-

noly i mezi chmelové pryskyřice. Bod tání této látky je 160 °C. XN je téměř nerozpustný ve vodě, petroletheru a pivu, krystalizuje v 50% ethanolu, 50% acetonu, kyselině octové, chloroformu, benzenu a toluenu.

IX je světle žlutá krystalická látka, méně rozpustná než XN. S ethanolovým roztokem chloridu železitého tvoří tmavě žluté sloučeniny [25].



Obr. 19: Xanthohumol

## 2.5 Resveratrol v ovoci a zelenině

Resveratrol (3,4,5-trihydroxystilben) je přírodní fytoalexin. Některé rostliny jej produkují jako odpověď na biotický a abiotický stres, např. napadení patogeny, UV záření, expozice ozónem nebo mechanické poškození. Resveratrol byl nalezen např. v révě vinné, podzemnici olejné, v mnoha léčivých rostlinách a dalších. Přípravky obsahující resveratrol byly využívány odedávna v japonské lidové medicíně (Kojo-kon) k léčbě opařenin a spálenin, zánětlivých onemocnění (plísňových, bakteriálních), k léčbě aterosklerosy, poruch metabolismu tuků a pro celou řadu dalších terapeutických účelů. Plevelná rostlina *Polygonum cuspidatum* je jedním z nejbohatších zdrojů. Roste především v Asii. Její extrakty z kořenů hrají důležitou roli v orientální medicíně. Chemopreventivní účinky resveratrolu souvisí s inhibicí hydroperoxidasy a cyklooxygenasy. Jejich aktivita je spojována s inicializací nádorového bujení, a také se snižováním hladiny cholesterolu v krvi.

Mezi rostliny, ve kterých se resveratrol hojně nachází, můžeme řadit i ovoce a zeleninu (cibule, listová zelenina), čaj, apod. Resveratrol byl prokázán také v kořeni arašídů (*Arachis hypogaea*), v arašídech samotných i v arašídových produktech. Pražené arašídy obecně obsahují nižší množství resveratrolu, ale ve vařených arašídech byl nalezen vyšší obsah [29].



Tab. 5: Obsah resveratrolu a kvercetinu v zelenině ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{suš.}}$ ) [29]

Zelenina	Resveratrol [ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{suš.}}$ ]	Kvercetin [ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{suš.}}$ ]
Čínské zelí	0,0092	0,073
Bílé zelí	0,0076	0,120
Červené zelí	0,0150	0,140
Květák	Stopy	0,031
Růžičková kapusta	0,0150	0,100
Kapusta	0,0070	0,760
Brokolice	0,0150	0,040
Česnek	0,0040	0,023
Žlutá cibule	Stopy	0,040
Červená cibule	0,0070	0,034
Čekanka	0,012	Stopy
Salát hlávkový	Stopy	Stopy
Ledový salát	Stopy	Stopy
Špenát	0,0160	0,038
Mrkev	0,0040	0,030
Petržel	0,0047	0,064
Červená řepa	0,0075	0,017

Tab. 6: Obsah resveratrolu a kvercetinu v ovoci ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{suš.}}$ ) [29]

Ovoce	Resveratrol [ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{suš.}}$ ]	Kvercetin [ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{suš.}}$ ]
Višeň obecná	0,0060	0,0065
Maliník obecný	Stopy	0,0044
Ostružiník	0,0008	0,0220
Jeřáb moravský	0,0009	0,0110
Borůvka černá	Stopy	0,0096
Černý rybíz	0,0160	0,0120
Červený rybíz	0,0012	0,0082
Angrešt	Stopy	0,0035

Tab. 7: Obsah resveratrolu a kvercetinu ve vzorcích burských oříšků ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{suš.}}$ ) [29]

Část	Resveratrol [ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{suš.}}$ ]	Kvercetin [ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{suš.}}$ ]
Jádro	0,0024	0,023
Vnější slupka	0,0092	0,110
Skořápka	0,0150	5,900

## 2.6 Víno

Ve víně se vyskytuje velké množství flavonoidů a ostatních polyfenolických látek. Zejména se jedná o anthokyany vytvářející typickou barvu vína, katechiny, kvercetin ve volné a glykosidicky vázané formě a příbuzný derivát stilbenů resveratrol. Právě tyto látky jsou z hlediska svých antioxidačních schopností hodnoceny jako nejcennější. Výživa, která je bohatá na přírodní antioxidanty, působí příznivě při prevenci tzv. civilizačních chorob, jako jsou např. onemocnění srdce a cév. Ta jsou jednou z nejčastějších příčin úmrtí. Obsah polyfenolických látek závisí na odrůdě révy, podmínkách pěstování révy a technologii výroby vína. [30].

Obr. 20: Réva vinná (*Vitis vinifera*)

## 2.7 Polyfenoly kakaa a jejich antikariogenní účinky

Možnému ochrannému účinku kakaa před zubním kazem se věnuje stále větší pozornost, ale již dříve publikovaná data týkající se antikariogenních účinků složek čokolády jsou sporná. Časné studie prokázaly, že vysoký obsah sacharózy ve stravě měl stejné kariogenní účinky ať už v přítomnosti nebo absenci kakaových bobů. Začlenění kakaového prášku

nebo čokolády do stravy vedlo ke snížení zubního kazu. Bylo také potvrzeno, že výrobky z kakaava obsahují inhibitory enzymu odpovědného za tvorbu plaku. Předpokládá se, že fenolické látky by mohly být zodpovědné za pozorované antikariogenní účinky kakaového prášku [16].

## 2.8 Sýry

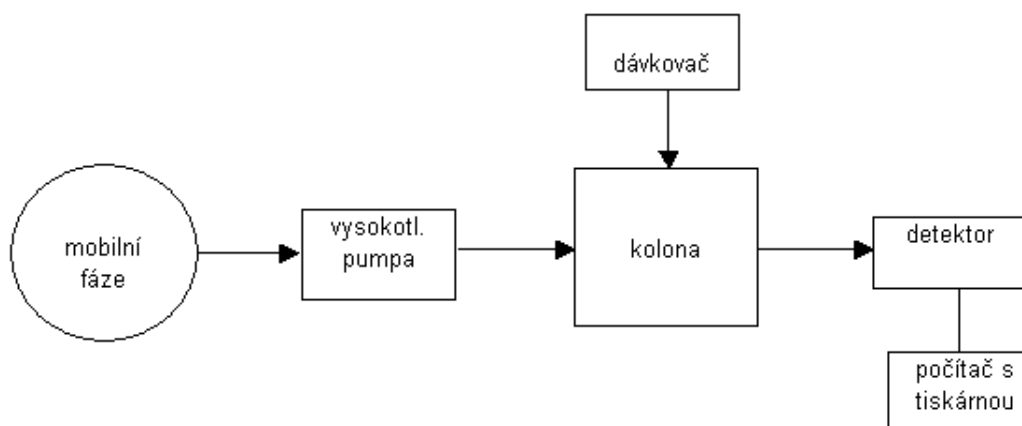
Byla publikována studie, která se zabývala vývojem funkčního sýrového výrobku obsahujícího polyfenolické látky. Byly také vyhodnocovány antioxidační vlastnosti a účinnost retence polyfenolů v produktu. Studie byla provedena vědci z jihokorejské univerzity ve spolupráci s výzkumnými pracovníky ze dvou kanadských institucí. Do sýřeniny bylo přidáno  $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$  jednotlivých polyfenolických látek, např. katechin, kyselina taninová, homovanilinová, hesperitin, epigallokatechin gallát, flavon a také  $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$  přírodních polyfenolických sloučenin, například extrakt z vinných hroznů, zeleného čaje a dehydrované brusinkové šťávy. Byla provedena řada měření, při nichž se vyhodnocovali retenční koeficienty pro fenolové látky a antiradikálové vlastnosti sýru.

Byly zjištěny vysoké retenční koeficienty, což dokazuje, že během výroby sýru se tyto látky neničí. Hesperitin a flavony se uchovávají v sýřenině ve vysokých koncentracích, jejich retenční koeficient dosáhl hodnot větších než 0,94. Hrubé polyfenolické sloučeniny, tj. extrakty z vinných hroznů, zeleného čaje a brusinková šťáva, měly také vysoký retenční koeficient v rozmezí od 0,74 do 0,87.

Během tohoto výzkumu byla vyhodnocována i antiradikálová aktivita sýrových výrobků. Antioxidanty mohou reakcí s volnými radikály interferovat s oxidačními procesy, s chelatací katalytických kovů nebo s reakcemi s pohlcovači kyslíku. V pokusu bylo zjištěno, že gely mléčných bílkovin s fenolovými kyselinami mají lepší kapacitu pohlcování volných radikálů a zlepšují funkční vlastnosti sýrového produktu. Přídavek fenolových kyselin lehce snižuje hodnotu pH mléka. Míra snížení je závislá na druhu přidané látky. Kyseliny homovanilinová a taninová snížily hodnotu pH z původních 6,76 na 6,55 a 6,67 a změnily také gelotvorné parametry sýřeniny. Přídavek přírodního hrubého extraktu snížil hodnotu pH pouze na 6,72 a 6,74. Kvůli těmto vlastnostem fenolových látek by se musel upravit proces výroby sýrů [31].

### 3 STANOVENÍ POLYFENOLŮ POMOCÍ METODY HPLC

Mezi metodami kapalinové chromatografie zaujímá významné místo varianta HPLC. Zkratka je odvozena od dvou přípustných názvů této metody a to „high performance liquid chromatography“ (vysokoučinná kapalinová chromatografie) nebo „high pressure liquid chromatography“ (vysokotlaká kapalinová chromatografie). Mobilní fází je v tomto případě kapalina. Stacionární fází je film příslušné látky zakotvený na povrchu nosiče nebo pevný adsorbent. Přístroj, na kterém se provádí HPLC analýzy se nazývá kapalinový chromatogram [32].



Obr. 21: Schématický náčrt kapalinového chromatografu [32]

Kapalinový chromatograf je sestaven z těchto hlavních částí: zásobníky s mobilní fází, vysokotlaká pumpa, dávkovač, kolona a detektor. Metoda HPLC existuje jako tzv. „normální“ a „reversní“.

Při normální HPLC je stacionární fáze polárnější než fáze mobilní. Při reversní HPLC je naopak stacionární fáze méně polární než fáze mobilní. Reversní HPLC bývá též označovaná jako RP HPLC (reverse phase HPLC) [32].

#### Mobilní fáze

Jako mobilní fáze vystupuje např. voda, methanol, acetonitril, pufrý a další. Zásobníky jsou skleněné láhve, kterých může být několik s navzájem různými mobilními fázemi, které je možné spolu automaticky mísit v předem zvoleném poměru. Mobilní fáze vstupuje do

interakce se složkami analyzované směsi a konkrétní složení mobilní fáze může významným způsobem ovlivňovat celou analýzu [32].

### Stacionární fáze

Stacionární fáze je tvořena mikročásticemi silikagelu (3 - 10  $\mu\text{m}$ ) na kterých je navázána vlastní stacionární fáze. Vlastní stacionární fáze může být tvořena například nepolárními uhlovodíky (C 8 – oktan, C 18 – oktadekan) [32].

## **3.1 Instrumentace v HPLC**

### **3.1.1 Čerpadlo**

Kapalina je do kolony čerpána pomocí pístových nebo membránových čerpadel. Dobré čerpadlo dosahuje průtoku v rozsahu od mikrolitru do desítek mililitru za minutu při tlaku 35 MPa. Materiál čerpadla (nerezová ocel, keramika nebo plast) nesmí být narušován mobilní fází a nesmí do ní uvolňovat žádné látky. Ventily řídící tok eluentu jsou často zhotoveny z pryže nebo safíru [33].

### **3.1.2 Směšovací zařízení**

Složení mobilní fáze může zůstat stálé (izokratická eluce) nebo se během separace mění (gradientová eluce). Naprogramované směšovací zařízení může s využitím zásobníků různých kapalin připravovat směs kapalin stálého složení nebo řídit změny ve složení výsledné mobilní fáze v průběhu separace [33].

### **3.1.3 Dávkovací zařízení**

Dávkování injekční stříkačkou přináší nevýhody z hlediska těsnosti, udržení tlaku a zejména vnášení stop materiálu injekční stříkačky. Pokud je použito injekční zařízení, musí být zhotoveno z inertních materiálů (nerezová ocel, titan). Injekční zařízení může být ovládáno ručně i automaticky [33].

### 3.1.4 Kolony

Pro většinu analýz jsou kolony zhotoveny z nerezové oceli. Kolony pro analytické stanovení jsou poměrně krátké (zpravidla 10, 15 nebo 25 cm)

Volba vhodné kolony má rozhodující význam, neboť výsledek chromatografické metody je určován kvalitou kolony a její náplní. Účinnost závisí na stacionární fázi, délce kolony a na jejím tvaru, také na úpravě vnitřního povrchu kolony a množství spojovacích částí. Jako ochrana hlavní kolony jsou používány předklony, které jsou umístěné mezi dávkovacím zařízením a čerpadlem, a chrání kolonu před nečistotami a nerozpustnými materiály [33].

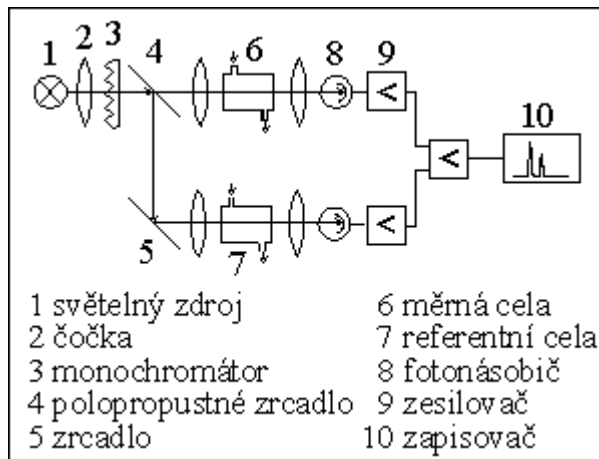


Obr. 22: Kolona [34]

### 3.1.5 Detektory

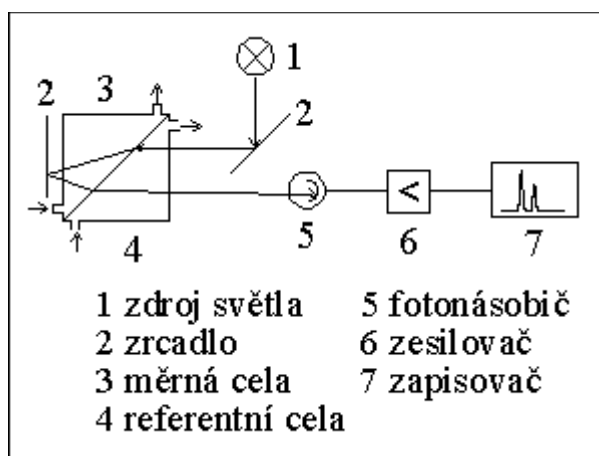
Detektory v HPLC by měly být selektivní pro analyty a málo citlivé na mobilní fázi. Mezi nejpoužívanější detektory patří:

- Fotometrický detektor – měří absorbanci eluátu vycházejícího z kolony. Pro optimální citlivost detektoru je nutné, aby byla zajištěna dostatečná absorpční dráha průtočné kvety, jíž prochází paprsek. Jednodušší detektory měří při jedné vlnové délce, složitější dovolují nastavení vlnové délky pomocí monochromátoru [33].



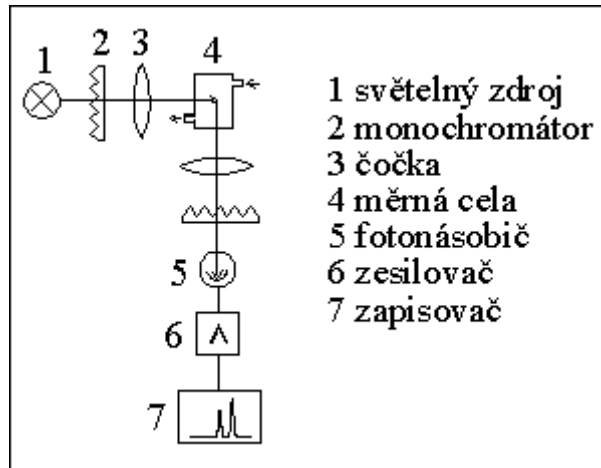
Obr. 23: Fotometrický detektor [35]

- Refraktometrický detektor – měří rozdíly mezi indexem lomu fluátu a čisté mobilní fáze. Obsahuje-li eluát složku, objeví se výchylka. Tento typ detektoru sice není příliš citlivý, ale je velmi univerzální, avšak není příliš citlivý. Při jeho použití je důležité přesně udržovat konstantní teplotu [33].



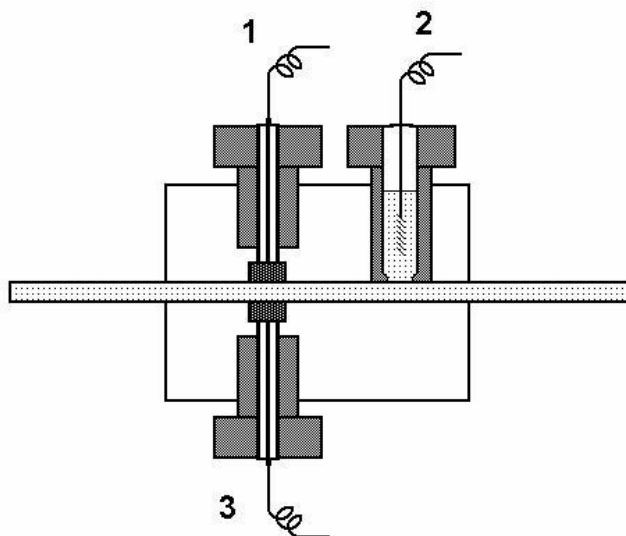
Obr. 24: Refraktometrický detektor [35]

- Fluorescenční detektor – je založen na principu fluorescence - schopnosti látek absorbovat ultrafialové záření a pak vysílat záření o vyšší vlnové délce, které se měří fotonásobičem kolmo na směr vstupujícího záření. Tento detektor je vysoce selektivní [33].



Obr. 25: Fluorescenční detektor [35]

- Elektrochemický detektor - dosahuje vysoké citlivosti. Elektrochemický detektor měří elektrodový potenciál, proud nebo kapacitu vyvolanou průchodem látky detektorem, ve kterém jsou umístěny elektrody s napětím pro elektrochemickou reakci. Systém může být zapojen ve dvouelektrodovém nebo tříelektrodovém zapojení. Podle podmínek měření se dělí elektrolytické metody na potenciostatické, kdy se měří při konstantním potenciálu pracovní elektrody a metody amperostatické, kdy se měří za konstantního proudu [33,34,36].



Obr. 26: Elektrochemický detektor [35]



### 3.2 Popis HPLC analýzy

Aparaturou protéká mobilní fáze, která je ze zásobních lahví vedena přes vysokotlakou pumpu do kolony, z ní do detektoru a dále pak do odpadu. Dávkovačem je do proudu mobilní fáze nadávkován vzorek (řádově několik málo  $\mu\text{l}$ ). Vzorek je unášen mobilní fází do kolony, kde dochází k separaci jednotlivých složek. Výstup z kolony vede do detektoru, kde jsou jednotlivé složky detekovány. Signál z detektoru je zaznamenáván pomocí PC a tisknut v podobě chromatogramu [32].

HPLC analýza je ve srovnání s GLC analýzou mnohem méně citlivá na teplotu kolony a průtokovou rychlost mobilní fáze. Je však citlivá na složení a pH mobilní fáze. Výhodou HPLC je schopnost analyzovat termolabilní látky (např. vitamíny a jiné), které by při použití plynové chromatografie degradovaly a byly by tak neanalyzovatelné. Analýzy některých směsí a látek je možné provádět jak metodou HPLC tak GC (např. mastné kyseliny) [32].

## 4 STANOVENÍ POLYFENOLŮ POMOCÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE (MS)

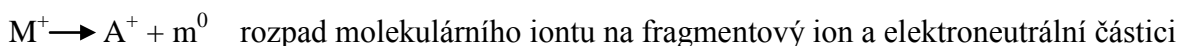
Hmotnostní spektrometrie (MS – Mass spectrometry) je spektrální metoda, která převádí vzorek na ionizovanou plynnou fázi a vzniklé ionty rozděljuje podle podílu jejich hmotnosti a náboje. Při vhodné interpretaci výsledků měření má metoda velmi dobrou vypovídací schopnost o struktuře analyzovaných látek. Těžištěm analytického využití hmotnostní spektrometrie je především stopová analýza organických látek s důrazem na zjištění jejich struktury [33, 37].

Spojení hmotnostního spektrometru se separačními metodami (zejména plynovou a kapalinovou chromatografií) výrazně zvyšuje selektivitu a umožňuje provádět identifikaci komponent vzorku ve složité matici [37].

Základní kroky v této metodě jsou:

- 1) Odpaření vzorku
- 2) Ionizace
- 3) Akcelerace iontů do hmotnostního analyzátoru
- 4) Separace iontů hmotnostním filtrem
- 5) Detekce iontů

Při ionizaci molekuly složky dochází obvykle k těmto reakcím:



Vysoké vakuum v zařízení brání vzájemným kolizím částic v plynné fázi. Ve většině spektrometrů nastane reakce za vzniku iontů a po ní probíhá analýza [33].

### 4.1 Instrumentace MS

Běžný hmotnostní spektrometr obsahuje tyto součásti: vstup vzorku, iontový zdroj, hmotnostní analyzátor, detektor.

### 4.1.1 Iontový zdroj

Tato součást ionizuje materiál podle analýzy (analytu). V prostoru iontového zdroje dochází k většině fragmentačních reakcí vedoucích k destrukci chemických vazeb vzniklého iontu. Ionty jsou pak transportovány magnetickými nebo elektrickými poli k hmotnostnímu analyzátoru. Použitý způsob ionizace zásadně ovlivňuje aplikační zaměření metody.

Podle množství dodané energie se mohou ionizační techniky dělit na tzv. měkké, při nichž je energetický přebytek dodaný ionizované molekule malý a pravděpodobnost fragmentace nízká, a na tzv. tvrdé, při nichž dodaná energie postačuje k rozsáhlejší fragmentaci primárně vzniklého iontu. Dalším třídícím kritériem může být skupenství, ve kterém se látka nachází při ionizaci. Nejběžnější jsou techniky ionizace v plynné fázi. Techniky ionizace v kondenzované fázi jsou vhodné zejména pro analýzu netěkavých látek.

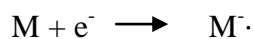
Největší význam při stanovení fenolických látek mají chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a elektrosprejová ionizace (ESI) [37, 38].

Typy ionizace:

- a) nárazem elektronů (EI)
- b) působením elektrostatického pole (FI, FD)
- c) chemickou ionizací (CI)
- d) nárazem rychlými atomy nebo ionty (FAB)
- e) ionizací fotony
- f) elektrosprejem (ESI) - velmi šetrná ionizační technika, vhodná pro biomolekuly nebo pro vzorky v roztoku (výstup z LC)
- g) ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI) [38]

#### 4.1.1.1 Ionizace elektronem (EI)

Je příkladem tvrdé ionizační techniky v plynné fázi. Energetickým procesem vedoucím k tvorbě iontů je interakce molekul analyzované látky s proudem urychlených elektronů. Může dojít k následujícím dějům:



Vzhledem k vysokému vakuu udržovanému v prostoru iontového zdroje, je z hlediska energetické stabilizace vzniklého iontu preferován vznik radikálaniontu.

Jako zdroj elektronů se nejčastěji používá žhavené rheniové nebo wolframové vlákno (katoda). Proud elektronů je směřován prostorem iontového zdroje směrem k anodě. Vzniklé ionty jsou z prostoru ionizace vytlačovány elektrostatickým polem pomocné elektroody (repeleru) udržované ve vhodném potenciálu. Proud iontů je dále urychlen a směřován z iontového zdroje soustavou akceleračních a fokusačních elektrod [37].

#### 4.1.1.2 *Chemická ionizace (CI)*

Je příkladem běžně používané měkké ionizační techniky. Primárním zdrojem je proud urychlených elektronů. Jejich energie však není přenášena na ionizovanou molekulu přímo, ale zprostředkovaně přes reakční médium. V ionizační komůrce je pod velkým tlakem (50 – 150 Pa) přítomno reakční médium. Vyšší tlak v iontovém zdroji výrazně zvyšuje pravděpodobnost mezimolekulárních a meziiontových interakcí. Výběr reakčního média pro chemickou ionizaci značně ovlivňuje množství energie předané v procesu chemické ionizace, a tím i rozsah možných fragmentací.

Konstrukce iontového zdroje pro chemickou ionizaci je prakticky totožná s konstrukcí zdroje EI. U většiny moderních hmotnostních spektrometrů se proto setkáváme s tzv. kombinovaným zdrojem EI – CI umožňujícím používat obě techniky ionizace [37].

#### 4.1.1.3 *Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)*

Vstupní kapilára, kterou se přivádí kapalná fáze z chromatografické kolony, ústí do pneumatického rozprašovače, jehož plán je vyhříván na velmi vysokou teplotu, až 700 °C. Dochází k efektivnímu rozprášení a odpaření kapalné fáze. V prostoru koronového výboje generovaného na hrotu tzv. koronové jehly dochází především k ionizaci par mobilní fáze a tvorbě chemicko-ionizačního plazmatu. Molekuly analyzovaných látek jsou pak následně ionizovány mechanismem chemické ionizace přenosem protonu za vzniku kvazimolekulárních iontů typu  $[M + H]$  nebo  $[M - H]$  [37].

#### 4.1.1.4 ESI - MS

Proces ionizace elektrosprejem, API a APCI lze shrnout ve 4 krocích:

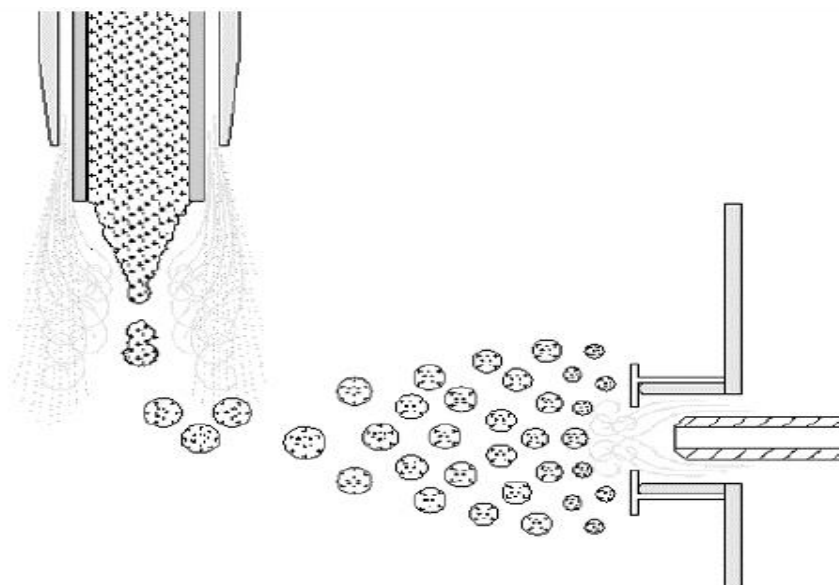
1) Vznik iontů

Vznik iontu v API (ionizace za atmosférického tlaku) - prostřednictvím elektrospreje dochází k více než jednomu mechanismu. Při správné identifikaci analytu a použití rozpouštědla mohou být tvořeny ionty v roztoku již před nebulizací - zmlžováním.

Pro ESI nejsou podmínkou předformované ionty. Proces vzniku aerosolu a desolvace vytváří silný elektrický náboj na povrchu kapky. To může vyvolat ionizace molekuly analytu na povrchu kapky [39].

2) Nebulizace - zmlžování (vznik aerosolu)

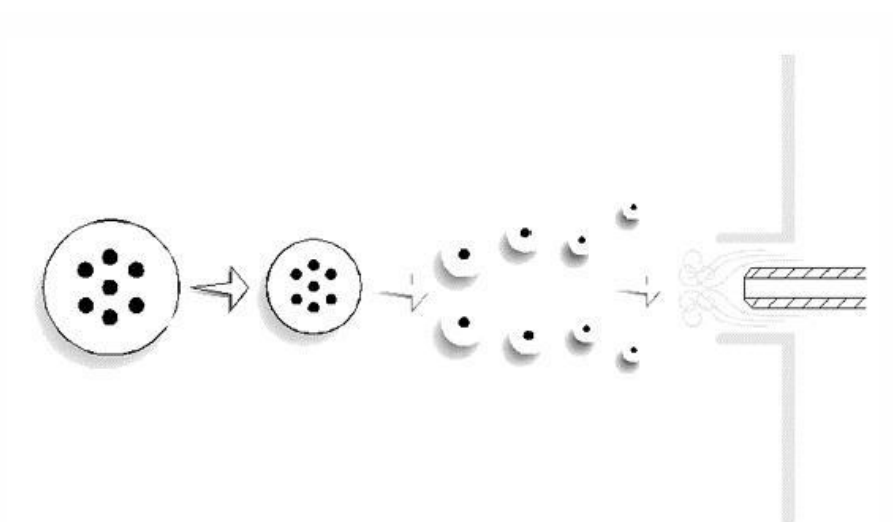
Začíná, když je roztok vzorku vstříknut jehlou do komory. Kvůli vysokému průtoku elektrospreje vstupuje nebulizovaný plyn do stříkací komory přes trubici, která obklopuje jehlu. Kombinace silné smykové síly, vzniklé při nebulizaci plynu, a silného elektrostatického pole v komoře přitahuje roztok vzorku a rozbíjí ho do kapiček. Jako rozptýlené kapičky jsou ionty jedné polaritě přednostně přitahovány k povrchu kapky do elektrostatického pole. V důsledku toho je vzorek současně nabitý a rozptýlený do jemného spreje nabitých kapiček - odtud název elektrosprej [39].



Obr. 27: Hrot jehly ve sprejové komoře [39]

### 3) Desolvatace

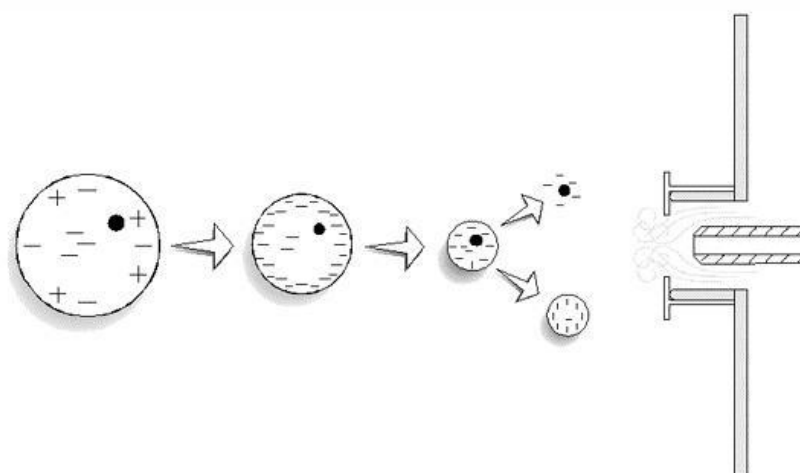
Předtím, než mohou být ionty analyzovány, musí být odstraněno rozpouštědlo. To se vypařuje pomocí protiproudového neutrálního sušícího plynu, obvykle dusíku, dále se zmenšuje průměr kapek a náboje se přibližují k sobě. Když se síla odporu rovná povrchovému napětí kapky, kapičky explodují [39].



Obr. 28: Desolvatace [39]

#### 4) Zplyňování iontů

Proces zplyňování iontů je předmětem mnoha vědeckých výzkumů, a stále existují rozdíly v názorech, pokud jde o konkrétní fyzikální proces. V modelu odpařování iontů, který je popsán zde, jsou ionty emitovány přímo z nabitých kapiček do plynného skupenství. Pokud dojde k odpaření rozpouštědla z kapek v přítomnosti silného elektrického pole, stává se povrch kapek velmi nabitým. Když pole vytvořené ionty na povrchu kapky přesahuje povrchové napětí, jsou ionty analytů emitovány přímo z kapky. Energie hydratace v rozpouštědle určuje snadnost desorpce iontů do plynné fáze. Obecně platí, že čím více je hydrofobní vzorek v rozpouštědle, tím lépe mohou být ionty desorbovány do plynného skupenství [39].



Obr. 29: Mechanismus zplyňování iontů uvnitř komory ESI [39]

#### 4.1.2 Hmotnostní analyzátor

Odděluje ionty podle jejich  $m/Q$  poměru. Existuje mnoho typů hmotnostních analyzátorů, statické či dynamické, nebo magnetické či elektrické.

Druhy analyzátorů:

- a) Kvadrupólový analyzátor (jednoduché, trojnásobné)
- b) Iontová past
- c) Průletový analyzátor (TOF)
- d) Hybridní (Q-TOF, Q-trap, TOF-TOF, trap-TOF, trap-ICR, ...)
- e) FT-MS (ICR-MS)

#### 4.1.2.1 *Kvadrupólový analyzátor*

Jedná se o čtyři kovové tyče kruhového nebo hyperbolického průřezu, které jsou připojeny ke zdrojům stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí. Ionty, které vlétnou do prostoru mezi tyčemi, se dostanou do střídavého elektrického pole a začnou oscilovat. Při vhodně zvolených hodnotách stejnosměrného a střídavého napětí a jejich vhodném poměru projdou kvadrupólem pouze ionty o určitém  $m/z$ , ostatní se dostanou na nestabilní dráhy a zachytí se na tyčích kvadrupólu nebo na stěnách přístroje. Postupnou změnou napětí vkládaných na kvadrupól je možno takto nechat projít ionty ve zvoleném intervalu hodnot  $m/z$  [37].

#### 4.1.2.2 *Iontová past*

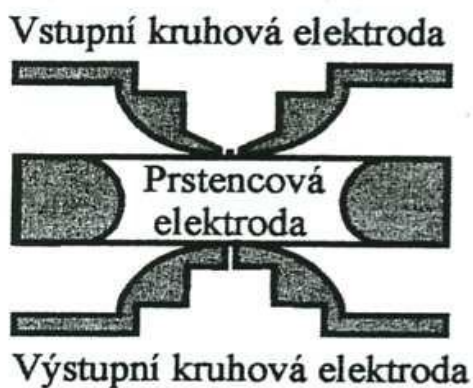
Ionty jsou pulzně přivedeny do pasti, zde jsou zachyceny a potom jsou postupně vypuzovány na detektor podle jejich  $m/z$ , jedná se v podstatě o trojrozměrný kvadrupól.

Iontová past je složena ze vstupní a výstupní kruhové elektrody a z prstencové středové elektrody. Vnitřní tvar těchto tří elektrod vychází z trojrozměrného téměř hyperbolického profilu. Díry ve středu čela umožňují iontům projít dovnitř a ven z pasti. Vysoké napětí RF potenciálu je aplikováno do kruhu, zatímco čela jsou uzemněna. Rozdíl oscilujícího potenciálu mezi kruhem a čelem elektrody tvoří kvadrupólová pole. V závislosti na úrovni napětí RF může pole zachytit ionty v určitém rozsahu hmotností.

K čelu iontové pasti se přivádí pomocné napětí. Toto dodatečné napětí se používá pro různé účely v průběhu izolace iontů, fragmentace, a dalších fází hmotnostní analýzy. Protože ionty nevznikají v iontové pasti, ale jsou přiváděny z externího zdroje, je třeba, aby existoval mechanismus, kterým mohou být ionty zachyceny v pseudo-potenciálu vytvořeného iontovou pastí. Jinak by ionty z externího zdroje prostě prošly přes první čelo do pseudo-potenciálu vytvořeného kvadrupólovým polem v pasti a dále by pokračovaly ven přes další čelo. Z tohoto důvodu je důležité, aby kolizní plyn byl přítomen v pasti a získal energii z paprsku iontů a způsobil tak zadržování alespoň jisté části iontů vstříknutých do iontové pasti. K dalším důležitým parametrům patří účinnost zachycování energie přicházející svazkem iontů,  $m/z$  hodnota a množství iontů a aktuální fáze napětí RF pro konkrétní iont v bodě injekce. Efektivnost se velmi liší, ale při provozním tlaku v iontové pasti cca  $3 \times 10$  mbar, lze u jednoho nabitého iontu o 500  $m/z$  očekávat celkovou účinnost zachycování přibližně 5 %. Akumulační časy pro záchyt iontů jsou přibližně 0,01 ms – 200 ms v závislosti na množství přiváděných iontů, doba excitace a kolize v pasti je cca 20 – 60 ms.



Změnou akumulací doby je dynamický rozsah analyzátoru iontové pasti značně rozšířen. Do pasti se zavádí He jako tzv. tlumící plyn o tlaku asi 0,005 Pa, protože tlumí oscilace v ose z, čímž se dosáhne významného zvýšení RP a zlepšení záchytu iontů [37, 39, 40].



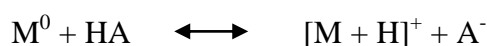
Obr. 30: Průřez iontovou pastí [37]

#### 4.1.3 Detektor

Detektor se skládá ze dvou kovových desek, které zaznamenávají průchody iontů. Detektory můžeme rozdělit na detektory pro přímá měření a na násobičové detektory. Výběr typu detektoru závisí na uvažované aplikaci. Detektory pro přímá měření jsou většinou součástí specializovaných zakázkových systémů. Násobičové detektory se standardně užívají u veškeré komerční instrumentace [38].

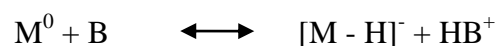
#### 4.2 Analýza v pozitivním módu

Analyty, které mají bazický charakter, jsou obvykle analyzovány v pozitivním módu. Molekula vzorku, který má bazický charakter, přijme proton z kyselějšího rozpouštědla. Analyty, které mají v molekule dusík, obvykle vykazují vysokou citlivost v mírně kyselém roztoku (pH <7). Ty, které nemají dusík, obvykle vykazují nižší odezvu v pozitivním módu. Uhlovodíky mají velmi nízkou odezvu v pozitivní módu [39].



### 4.3 Analýza v negativním módu

Analyty, které jsou kyselé povahy, jsou analyzovány v záporném módu. Molekula vzorku (kyselina) ztrácí proton v zásaditém ( $\text{pH} > 7$ ) roztoku, a stává se záporně nabitou. Analyty s funkčními skupinami, které odštěpují proton snadno, jako jsou například karboxylové kyseliny nebo sulfonové kyseliny, vykazují nejlepší citlivost. Analyty, které jsou polární, ale neobsahují žádné kyselé skupiny, vykazují menší citlivost. V ESI je negativní ionizace obecně méně citlivá než pozitivní ionizace [39].



## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 5 METODIKA

### 5.1 Použité chemikálie

Acetonitril pro HPLC (Lachner s.r.o.)

Metanol pro HPLC a MS (Chromservis s.r.o.)

Kyselina trifluoroctová (Acros)

Destilovaná a deionizovaná voda

Standardy:

- kyselina gallová (Labicom)
- kyselina ferulová (Sigma Aldrich)
- kyselina sinapová (Sigma Aldrich)
- kyselina kumarová (Sigma Aldrich)
- kyselina kávová (Sigma Aldrich)
- katechin (Sigma Aldrich)
- theofylin (Labicom)
- kofein (Labicom)
- rutin (Sigma Aldrich)
- resveratrol (Sigma Aldrich)
- EC (Extrasynthese)
- EGCG (Extrasynthese)
- EGC (Extrasynthese)
- ECG (Extrasynthese)

### 5.2 Použité přístroje a pomůcky

Aparatura pro HPLC – UV/VIS (Dionex Ultimate 3000, USA):

- odplynovací modul

- pumpy (SD a RS pumpy)
- detektor UV/VIS DAD – 3000 (RS) a MWD – 3000 (RS)
- autosampler WPS – 3000 SL a WPS – 3000 RS
- kolona Dionex Aclaim 120 (150 mm x 2,1 mm; 5 µm; Německo)
- kolona Watrex (250 mm x 4,0 mm; 5 µm, USA)
- PC s vyhodnocovacím programem Chromeleon a Hystar ( USA)

Hmotnostní spektrometr Amazon X (Bruker, Německo))

Analytické váhy (Alfa 210 LC, SCHOELLER CZ)

Chladnička (Whirlpool, CZ)

Nylonový mikrofiltr LUT Syringe (13 mm, 0,45 µm)

Mikropipeta

Běžné laboratorní sklo a pomůcky

## 5.3 Analyzované vzorky

### 5.3.1 Sypaný pravý černý čaj (Assasm Clasic Blend)

Vzorek byl zakoupen ve specializovaném obchodě Oxalis v OC Čepkov. Z země původu je Indie. Dle informací z etikety se jedná o klasickou směs assámských čajů, vhodnou na ranní popíjení s mlékem. Černohnědé pravidelné lístky dávají vznik hnědooranžovému nálevu s příjemnou sladovou vůní. V chuti je čaj vydatný, nasládlý s medovými tóny. Výrobce uvádí, že čaj má být zalit vroucí vodou v poměru 1,5 dcl na jednu čajovou lžičku a má být ponechán louhovat 3 – 5 minut. Lze připravit jeden nálev.



Obr. 31: Černý čaj - Assasm Clasic Blend

### 5.3.2 Sypaný pravý zelený čaj (Ceylon Green Gowrakele)

Vzorek byl zakoupen ve specializovaném obchodě Oxalis v OC Čepkov. Z země původu je Srí Lanka. Dle informací z etikety se jedná o ojedinělou ceylonskou raritu. Čaj je produkován na základě čínského výrobního postupu. Zelené lístky jsou svinuté do pravidelných kuliček. Nálev je čirý, chuť nasládlá s minimem tříslovin. Výrobce uvádí, že čaj má být zalit vodou o teplotě 70 – 80 °C v poměru 1,5 dcl na jednu čajovou lžičku a má být ponechán louhovat 3 – 5 minut. Lze připravit dva nálevy.



Obr. 32: Zelený čaj - Ceylon Green Gowrakele

### 5.3.3 Sypaný pravý bílý čaj ( Shou Mei „čaj dlouhověkosti“)

Vzorek byl zakoupen ve specializovaném obchodě Oxalis v OC Čepkov. Z země původu je Čína. Dle informací z etikety je čaj pro svou rezavou barvu čajových lístků a pupenů nazýván „obočím dlouhověkosti“. Nálev má chuť lehce vanilkovou a bambusovou. Čaj je vhodný ke každodenní konzumaci. Výrobce uvádí, že čaj má být zalit vodou o teplotě 90 °C v poměru 1,5 dcl na jednu čajovou lžičku a má být ponechán louhovat 5 minut. Lze připravit tři nálevy.



Obr. 33: Bílý čaj - Shou Mei

## 5.4 Metoda HPLC

Pro stanovení polyfenolických látek byla zvolena metoda HPLC s UV/VIS detekcí. Bylo k dispozici 14 standardů, a to: EC, EGCG, ECG, EGC, rutin, katechin, kyselina gallová, theofylin, kofein, kyselina ferulová, kyselina kumarová, kyselina kávová, kyselina sinapová, resveratrol. Přestože kofein a theofylin z hlediska klasifikace nepatří mezi polyfenolické látky, byly zde zařazeny jako doprovodné látky polyfenolů.

### 5.4.1 Příprava mobilní fáze A a B

Byla připravena mobilní fáze A o složení deionizovaná voda : acetonitril : kyselina trifluoroctová (TFO) v poměru 95 : 5 : 0,35

Také byla připravena mobilní fáze B o složení deionizovaná voda : acetonitril : kyselina trifluoroctová (TFO) v poměru 50 : 50 : 0,25

### 5.4.2 Gradientová eluce

Gradientová eluce probíhala při teplotě 30 °C a tlaku cca 160 bar. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 1 ml.min<sup>-1</sup>. Průběh gradientové eluce popisuje následující tabulka.

Tab. 8: Gradientová eluce

Čas (min)	Množství mob. fáze B (%)	Množství mob. fáze A (%)
0 – 5	15	85
5 – 10	20	80
10 – 15	20	80
15 – 20	30	70
20 – 25	50	50
25 – 27	30	70
27 - 35	15	85

### 5.4.3 Stanovení kalibračních křivek pro jednotlivé standardy

#### 5.4.3.1 Příprava kalibrační řady

Pro kalibraci byly všechny standardy připravovány stejným způsobem. Nejprve bylo naváženo 0,001 g standardu, který byl poté kvantitativně převeden do 10 ml metanolu, tímto bylo dosaženo koncentrace 100 µg.ml<sup>-1</sup>. Dále pak byla ze zásobního roztoku připravena kalibrační řada o koncentracích 20 µg.ml<sup>-1</sup>, 30 µg.ml<sup>-1</sup> a 50 µg.ml<sup>-1</sup>. Pro přípravu koncentrace 20 µg.ml<sup>-1</sup> bylo pipetováno 0,3 ml zásobního roztoku a 1,2 ml metanolu. Pro přípravu koncentrace 30 µg.ml<sup>-1</sup> bylo pipetováno 0,3 ml zásobního roztoku a 0,7 ml metanolu a pro přípravu koncentrace 50 µg.ml<sup>-1</sup> bylo pipetováno 0,7 ml zásobního roztoku a 0,7 ml metanolu. Standardy o požadované koncentraci byly připravovány do vialek o maximálním objemu 1,5 ml.

#### 5.4.3.2 Vlastní kalibrace standardů

Měření probíhalo na koloně Watrex (250 mm x 4,0 mm; 5 µm). Eluce byla prováděna gradientově se dvěma mobilními fázemi, viz kapitoly 4.4.1 a 4.4.2. Byl použit DAD detektor. Absorbance byla měřena při vlnových délkách 205, 210, 275 a 375 nm. Kalibrační křivka byla sestrojena jako závislost plochy píku [mAU.s] na koncentraci standardu [µg.ml<sup>-1</sup>]. Každý bod kalibrační křivky byl proměřen dvakrát. Výsledky stanovení kalibračních křivek standardů jsou uvedeny v kapitole 6.1.1.



#### 5.4.4 Příprava vzorků

Všechny vzorky byly připravovány stejným způsobem. S přesností na 0,001 g byl navážen 1 g vzorku. Vzorek byl poté extrahován v 50 ml deionizované vody ve vodní lázni o teplotě 25 °C po dobu 24 hodin. Získaný extrakt byl zfiltrován přes mikrofiltr o velikosti porů 0,45 µm.

#### 5.4.5 Měření vzorků

Po přípravě uvedené v kapitole 4.4.4 byly vzorky podrobeny analýze pomocí HPLC s UV/VIS detekcí. Měření probíhalo na koloně Watrex (250 mm x 4,0 mm; 5 µm). Eluce byla prováděna gradientově se dvěma mobilními fázemi, viz kapitoly 4.4.1 a 4.4.2. Průběh gradientové eluce byl popsán v kapitole 4.4.2. Analýza probíhala při teplotě 30 °C a tlaku cca 160 bar. Byl použit DAD detektor. Absorbance byla měřena při vlnových délkách 205, 210, 275 a 375 nm. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 1 ml.min<sup>-1</sup>. Doba analýzy byla nastavena na 35 minut.

### 5.5 Metoda HPLC/ESI – MS

Pro analýzu polyfenolických sloučenin lze použít reverzní kapalinovou chromatografii s následnou hmotnostní detekcí a elektrosprejem jako iontovým zdrojem. Užití LC/MS v analýze potravin poskytuje důležité informace o struktuře cílové nebo neznámé látky přímo v matricích.

Z tohoto důvodu byla tato metoda vybrána pro stanovení polyfenolů i v této práci. Jako zdroj ionizovaných iontů byl tedy zvolen elektrosprej (ESI – MS), jelikož ESI má vhodnější využití u polárních látek, zatímco jiný druh ionizátorů, jako je API a APCI je vhodnější použít spíše u látek méně polárních.

Spektra jednotlivých standardů i samotných vzorků byla stanovena v režimu ultra scan a to v kladném a záporném módu a také v módu MS/MS. Byla nasnímána spektra 14 standardů: rutinu, katechinu, teofylinu, kofeinu, kyseliny gallové, kyseliny ferulové, kyseliny fumarové, kyseliny kumarové, kyseliny sinapové a resveratrolu, EC, EGCG, ECG, a EGC. Dále byly analyzovány vzorky stejné jako u metody HPLC.

#### 5.5.1 HPLC/MS analýza flavonoidů

Ionty, které vznikají v pozitivním módu rozštěpením dvou vazeb C kruhu základní struktury flavonoidů (flavan), jsou označovány A<sup>+</sup> a B<sup>+</sup>. Ion A obsahuje A-kruh, ion B zase B-

kruh. Když je využíván negativní ionizační mód, značí se vzniklé ionty  $A^-$  a  $B^-$ . Ionty vzniklé odštěpením X části z těchto iontů jsou označovány jako  $[A^\pm - X]$  a  $[B^\pm - X]$ .

Opačná Diels-Alderova čili retro Diels-Alderova reakce (RDA) je důležitá štěpící reakce flavonoidů. Může nastat v šestičlenných cyklických molekulách obsahujících dvojnou vazbu. Jejím principem je přemístění tří elektronových párů v cyklickém kruhu. Důsledkem tohoto nového uspořádání je rozštěpení dvou s-vazeb a vznik dvou p-vazeb [41, 42].

### 5.5.1.1 *Fragmentace*

RDA je nejdůležitějším způsobem fragmentace pro flavanony, flavony a flavonoly, ale vyskytuje se také u isoflavonů. Toto štěpení dává vzniknout 1; 3  $A^+$  a 1; 3  $B^+$  iontům (čísla před označením iontu představují rozštěpené vazby na C kruhu). Stejně tak probíhá fragmentace prostřednictvím RDA i v negativním módu [41, 42].

Fragmenty běžné pro většinu molekul nejen polyfenolických látek vznikají ztrátou vodíku (1 Da), vody (18 Da), skupin CO (28 Da) a  $C_2H_2O$  (42 Da). Na druhou stranu může také dojít k navázání H (1 Da), vody a skupin, jako jsou  $NH_4^+$  (18 Da) nebo  $CH_3$  (15 Da), a nebo k navázání Na (23 Da), což je velice časté. Výjimku netvoří ani struktury vzniklé vzájemným spojením dvou a více molekul téže látky.

### 5.5.2 Parametry analýzy

Jsou zde popsány nejvýznamnější parametry analýzy pomocí ESI – MS. Všechny parametry jsou definovány pro pozitivní, negativní a pro MS/MS mód, jelikož v těchto módech byla snímána spektra jak standardů, tak samotných vzorků.

Tab. 9: Parametry MS analýzy

	<b>Pozitivní mód</b>	<b>Negativní mód</b>	<b>MS/MS</b>
<b>Skenovací mód</b>	ultrascan	ultrascan	ultrascan
<b>Napětí na kapiláře</b>	-4200 V	-4200 V	-4200 V
<b>Mřížkové napětí</b>	-500 V/-38 nA	-500 V/-35 nA	-500 V/-35 nA
<b>Tlak zmlžovače</b>	2 bar	2 bar	2 bar
<b>Sušící plyn</b>	10 l.min <sup>-1</sup>	10 l.min <sup>-1</sup>	10 l.min <sup>-1</sup>
<b>Teplota sušícího plynu</b>	300°C	300°C	300°C

	<b>Pozitivní mód</b>	<b>Negativní mód</b>	<b>MS/MS</b>
<b>Maximální akumulační čas</b>	10 ms	20 ms	4 ms
<b>Skutečný skenovací rozsah</b>	70 – 1500 m/z	70 – 1500 m/z	100 – 650 m/z
<b>Terčová rychlost</b>	1000 m/z	1000 m/z	350 m/z

### 5.5.3 Stanovení MS spekter standardů

Všechny standardy byly připravovány stejným způsobem. Bylo naváženo 0,001 g standardu, který byl poté kvantitativně převeden do 10 ml metanolu, tím byla získána koncentrace  $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Následně bylo ze zásobního roztoku odpipetováno 0,300 ml do vilaky. K tomuto množství bylo přidáno 1,2 ml metanolu, čímž vznikl roztok standardu o koncentraci  $20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

Takto připravený standard byl manuálně vstříkovan do hmotnostního spektrometru prostřednictvím stříkačky Hamilton o objemu 500  $\mu\text{l}$ .

Postupně byla nasnímána hmotnostní spektra všech standardů v pozitivním, negativním a MS/MS módu v režimu ultra scan. Ze spekter byly vybrány nejvýznamnější fragmenty, které byly následně použity při vyhodnocování hmotnostních spekter vzorků.

### 5.5.4 Stanovení MS spekter vzorků

Nejdříve byly připraveny vzorky. Byl navážen 1 g vzorku s přesností na 0,001. Následně byl vzorek kvantitativně převeden do 50ml odměrné baňky a doplněn deionizovanou vodou po rysku. Vzorky byly ponechány v 25°C vodní lázni po dobu 24 hodin. Poté byl extrakt přefiltrován přes mikrofiltr o velikosti pórů 0,45  $\mu\text{m}$ . Takto připravené vzorky byly podrobeny analýze pomocí HPLC/MS. Nejdříve byly vzorky aplikovány na chromatografickou kolonu Watrex (250 mm x 4,0 mm; 5  $\mu\text{m}$ ). Eluce byla prováděna gradientově se dvěma mobilními fázemi, viz kapitoly 4.4.1 a 4.4.2. Průběh gradientové eluce byl popsán v kapitole 4.4.2. Analýza probíhala při teplotě 30 °C a tlaku cca 80 bar. Byl použit DAD detektor. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,5 ml.min<sup>-1</sup>. Doba analýzy byla nastavena na 35 minut. Jednotlivé složky vzorku byly po průchodu chromatografickou kolonou detekovány hmotnostním spektrometrem Amazon. Parametry MS analýzy jsou popsány

v kapitole 5.5.2. Hmotnostní spektra vzorků byla snímána stejně jako u standardů v pozitivním, negativním a MS/MS módu v režimu ultra scan.

## 5.6 Statistické zpracování dat

Pro statistické vyhodnocení výsledků byly použity následující vzorce:

Aritmetický průměr: 
$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Směrodatná odchylka: 
$$S = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

## 6 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 6.1 Metoda HPLC

#### 6.1.1 Sestrojení kalibračních křivek pro stanovení vybraných polyfenolů metodou HPLC

Podle postupu popsaného v kapitole 4.4.5 byly změřeny plochy píků u jednotlivých koncentrací kalibrační řady pro všechny standardy. Jednotlivé kalibrační křivky byly sestrojeny jako závislost ploch píků (mAU.s) na jejich koncentracích ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Hodnoty signálů pro sestrojání kalibračních křivek byly měřeny při různých vlnových délkách, a to při 205, 210, 275 a 375 nm. Tyto vlnové délky byly zvoleny na základě informací získaných z odborné literatury. Bohužel měření při vlnové délce 375 nm neposkytlo žádné výsledky, protože detekce při těchto hodnotách není dostatečně citlivá. Pro stanovení kalibračních křivek byla vybrána vlnová délka 205 nm, jelikož píky při této vlnové délce ve většině případů vykazovaly největší intenzitu, a také tato vlnová délka poskytla přesnější určení retenčních časů. Standardy byly připraveny a měřeny podle postupu v kapitole 4.4.3. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce 11 - 19 a na obrázcích 34 - 42.

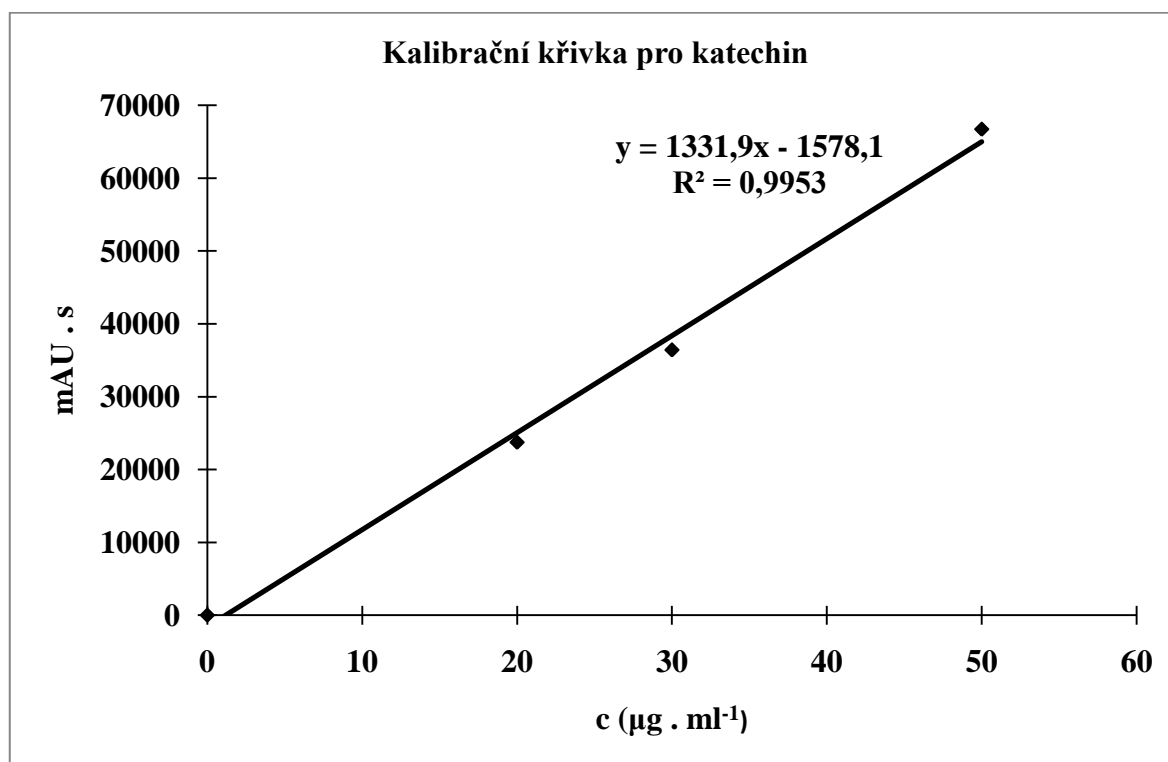
Tab. 10: Retenční časy jednotlivých standardů [min]

Rutin	22,09	Kys. kumarová	14,50
Katechin	6,98	Kys. ferulová	17,98
Theofylin	4,99	Kys. sinapová	18,77
Kofein	8,72	EGC	5,89
Kys. gallová	2,99		

## 6.1.1.1 Kalibrační křivka pro standard katechin

Tab. 11. Kalibrace katechinu při vlnové délce 205 nm

Koncentrace [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	Plocha píku [mAU.s]
20	23 739,42
20	23 736,19
30	36 661,48
30	36 175,70
50	66 855,90
50	66 592,51

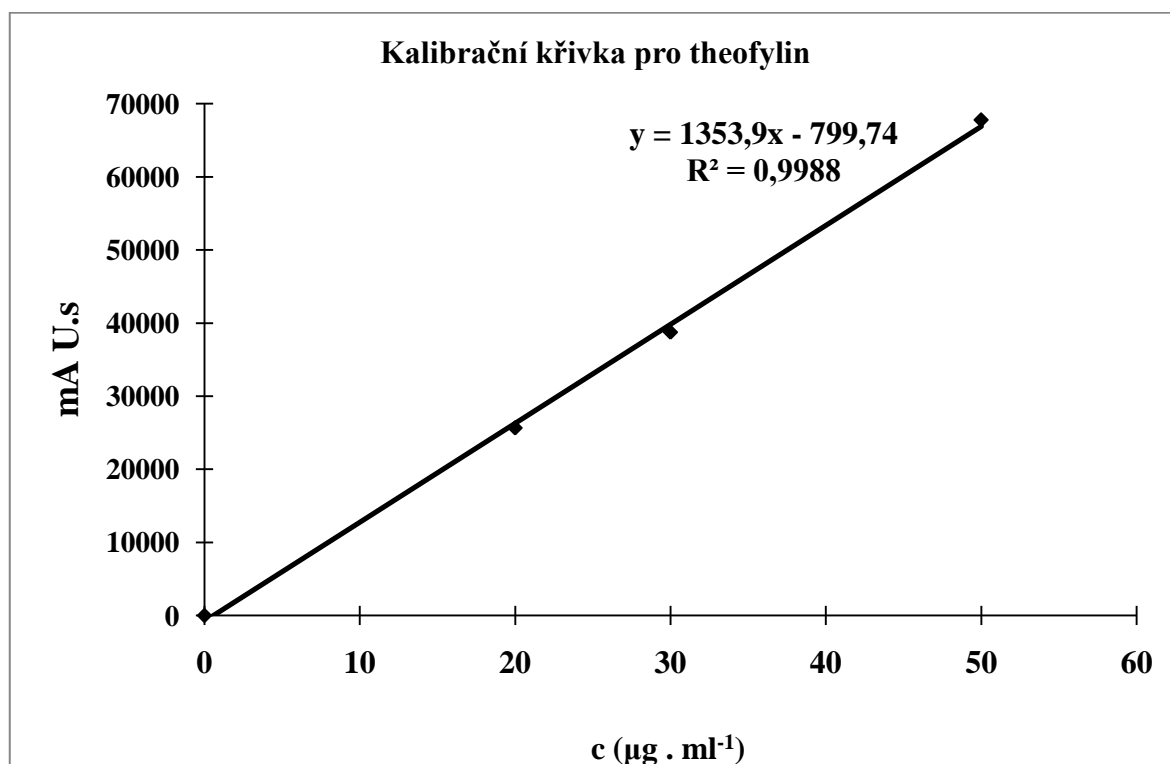


Obr. 34: Kalibrační křivka katechinu při vlnové délce 205 nm.

## 6.1.1.2 Kalibrační křivka pro standard theofylin

Tab. 12. Kalibrace theofylinu při vlnové délce 205 nm

Koncentrace [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	Plocha píku [mAUs]
20	25 656,75
20	25 657,22
30	38 876,96
30	38 619,42
50	67 655,76
50	67 910,54

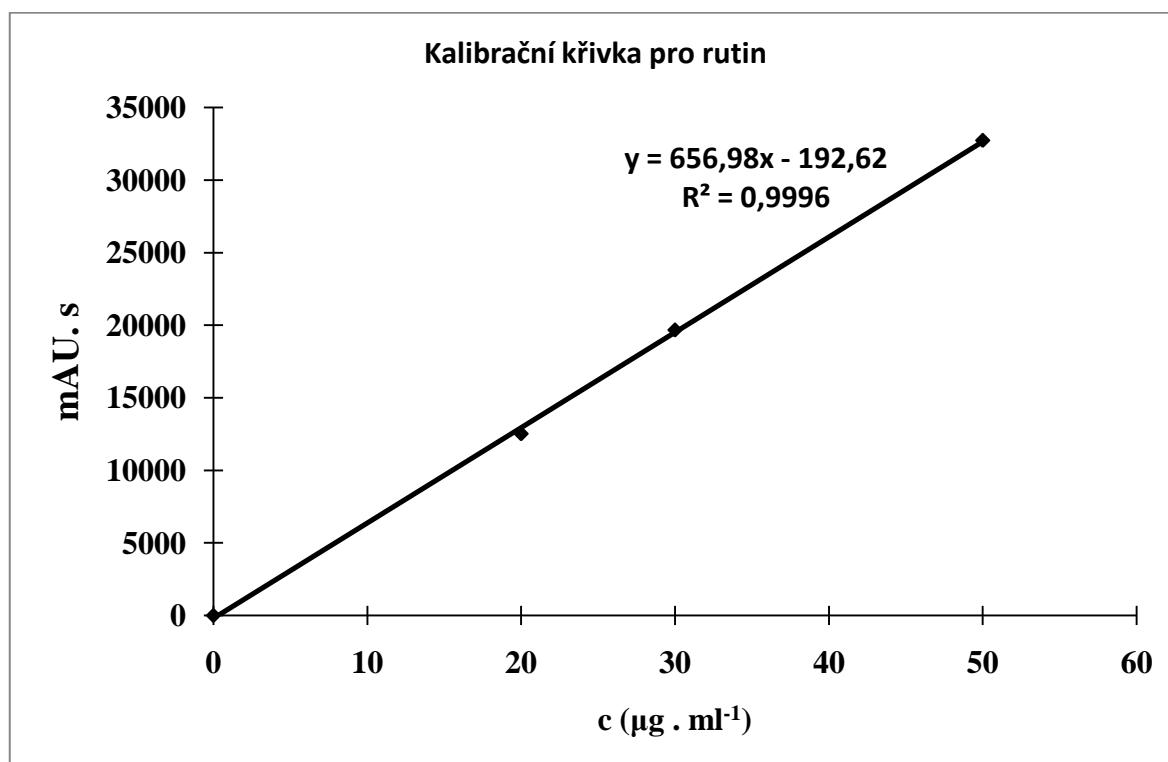


Obr. 35: Kalibrační křivka theofylinu při vlnové délce 205 nm

## 6.1.1.3 Kalibrační křivka pro standard rutin

Tab. 13: Kalibrace rutinu při vlnové délce 205 nm

Koncentrace [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	Plocha píku [mAU.s]
20	12 517,87
20	12 528,43
30	19 658,91
30	19 683,06
50	32 797,92
50	32 668,89



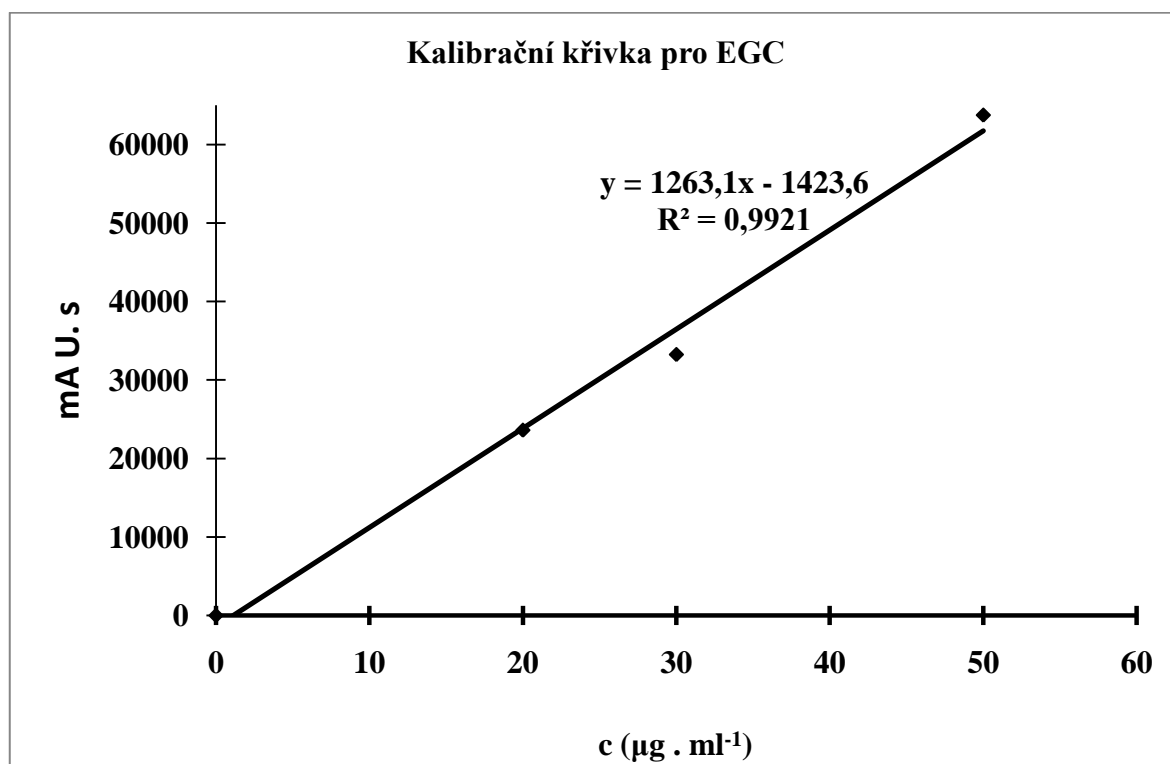
Obr. 36. Kalibrační křivka rutinu při vlnové délce 205 nm



## 6.1.1.4 Kalibrační křivka pro standard epigallokatechin (EGC)

Tab. 14: Kalibrace EGC při vlnové délce 205 nm

Koncentrace [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	Plocha píku [mAUs]
20	23 537,17
20	23 687,72
30	33 392,18
30	33 107,39
50	63 324,78
50	64 183,13

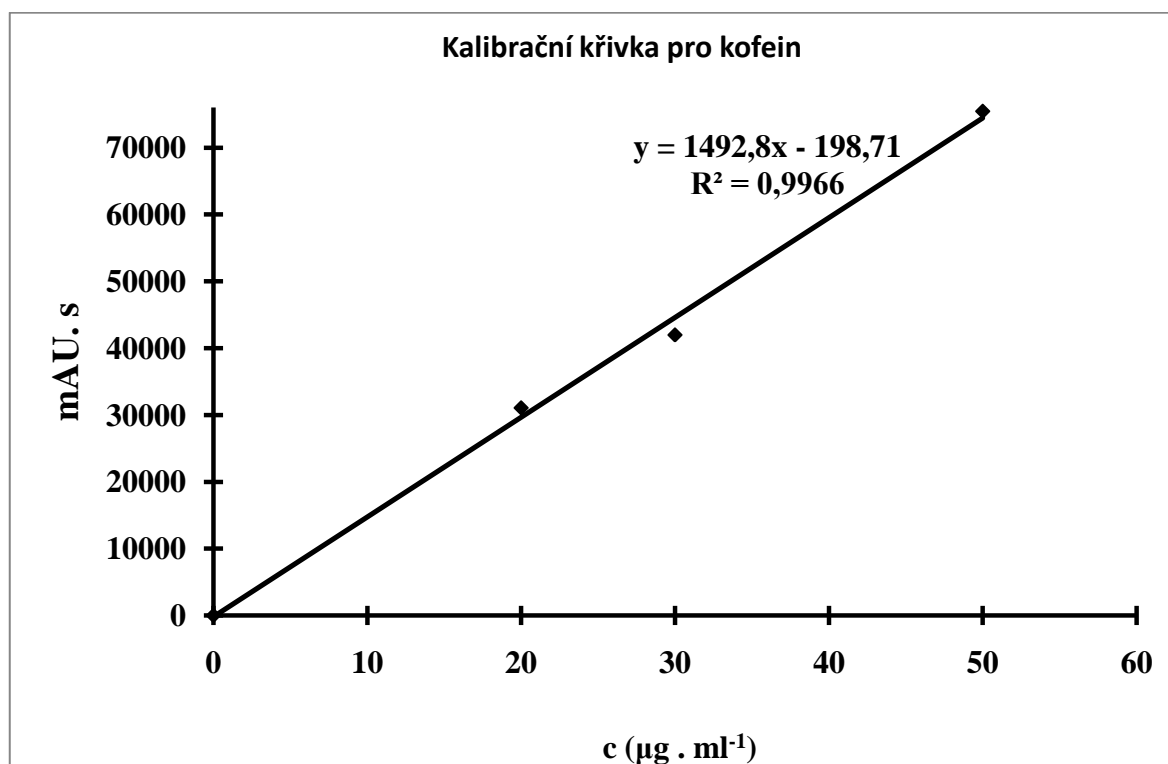


Obr. 37: Kalibrační křivka EGC při vlnové délce 205 nm.

## 6.1.1.5 Kalibrační křivka pro standard kofein

Tab. 15: Kalibrace kofeinu při vlnové délce 205 nm

Koncentrace [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	Plocha píku [mAU.s]
20	31 046,59
20	31 084,65
30	41 993,25
30	41 964,34
50	75 407,80
50	75 482,97

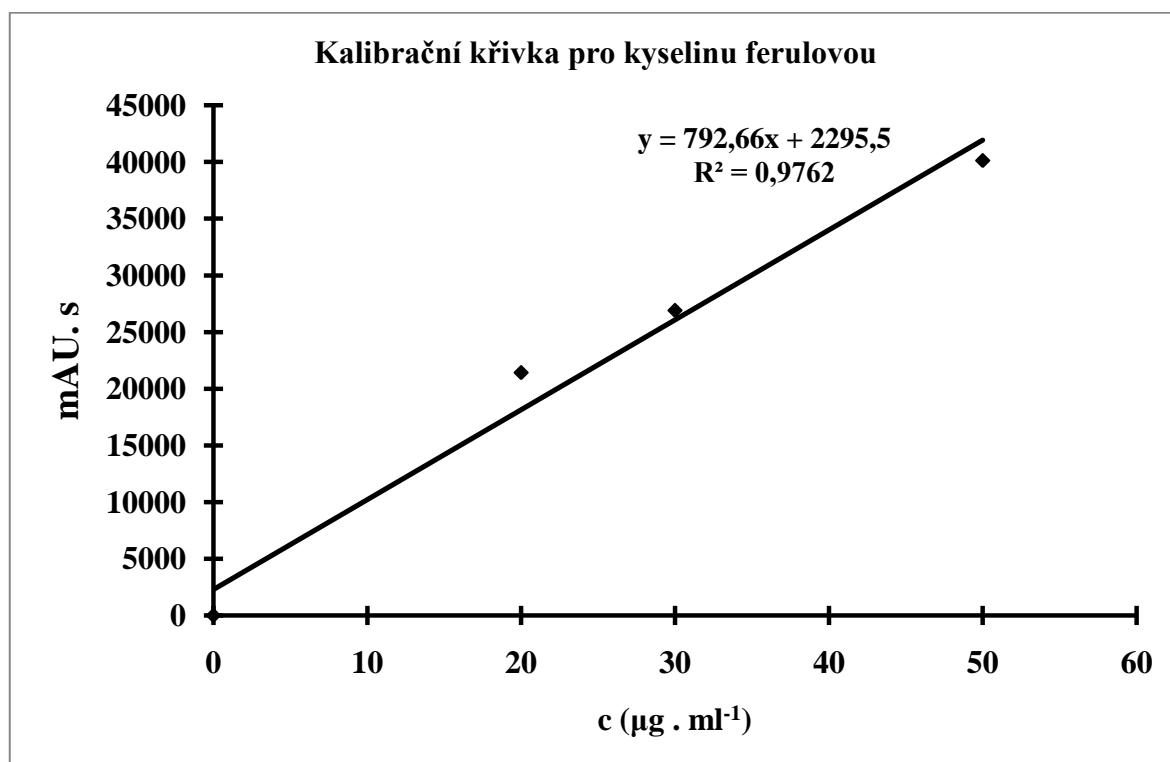


Obr. 38: Kalibrační křivka kofeinu při vlnové délce 205 nm

## 6.1.1.6 Kalibrační křivka pro standard kyselina ferulová

Tab. 16: Kalibrace kyseliny ferulové při vlnové délce 205 nm

Koncentrace [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	Plocha píku [mAU.s]
20	21 447,07
20	21 396,38
30	26 984,58
30	26 824,41
50	40 145,62
50	40 098,27

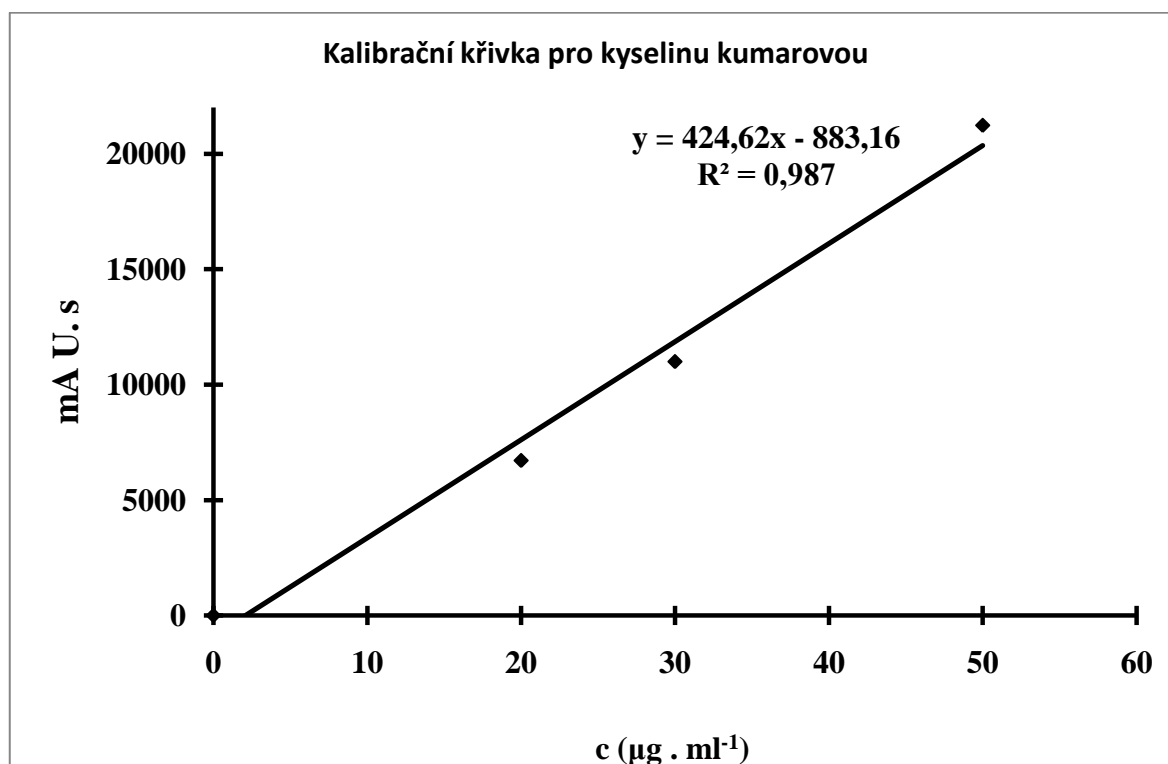


Obr. 39: Kalibrační křivka kyseliny ferulové při vlnové délce 205 nm

## 6.1.1.7 Kalibrační křivka pro standard kyselina kumarová

Tab. 17: Kalibrace kyseliny kumarové při vlnové délce 205 nm

Koncentrace [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	Plocha píku [mAU.s]
20	68 06,99
20	66 15,57
30	11 040,56
30	10 948,18
50	21 253,54
50	21 193,47

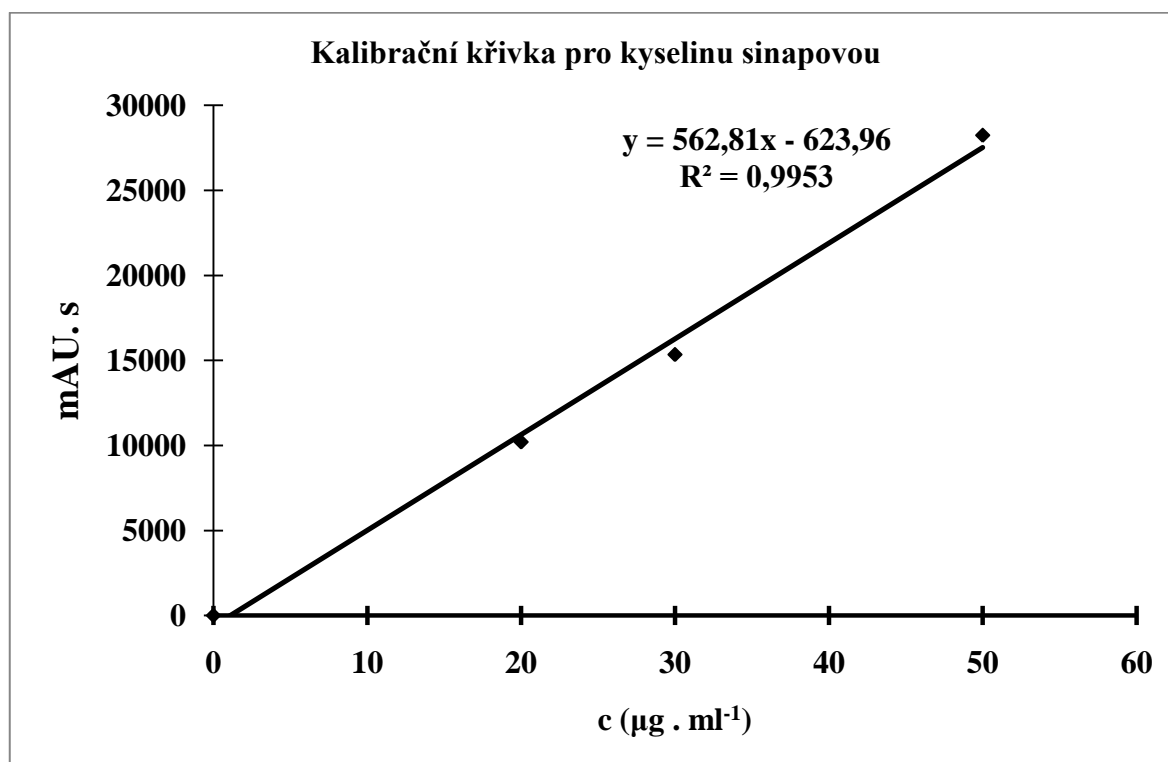


Obr. 40: Kalibrační křivka kyseliny kumarové při vlnové délce 205 nm

## 6.1.1.8 Kalibrační křivka pro standard kyselina sinapová

Tab. 18: Kalibrace kyseliny sinapové při vlnové délce 205 nm

Koncentrace [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	Plocha píku [mAU.s]
20	10 173,1
20	10 233,92
30	15 276,21
30	15 411,38
50	28 182,84
50	28 293,75

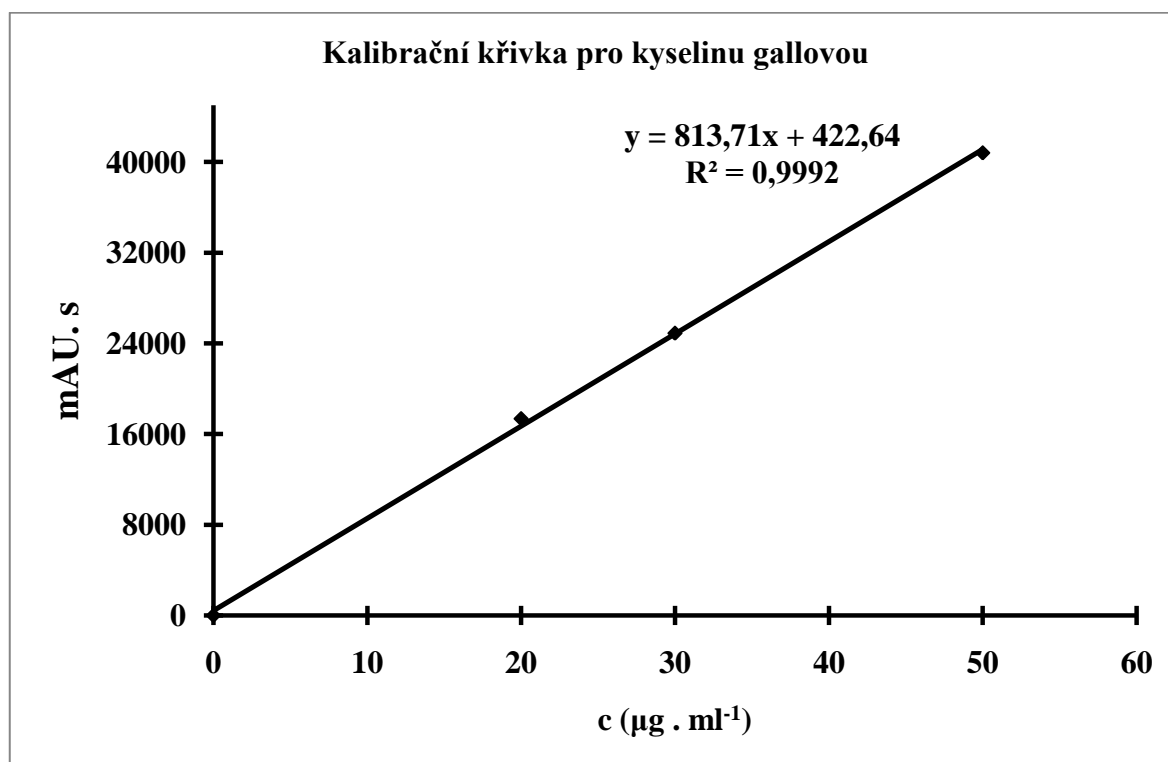


Obr. 41: Kalibrační křivka kyseliny sinapové při vlnové délce 205 nm

## 6.1.1.9 Kalibrační křivka pro standard kyselina gallová

Tab. 19: Kalibrace kyseliny gallové při vlnové délce 205 nm

Koncentrace [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	Plocha píku [mAU.s]
20	17 365,38
20	17 351,91
30	24 994,23
30	24 800,98
50	41 024,75
50	40 585,10



Obr. 42: Kalibrační křivka kyseliny gallové při vlnové délce 205 nm

### 6.1.2 Výsledky stanovení polyfenolických látek ve vzorcích čajů

Ke stanovení byla použita kolona Watrex (250 mm x 4,0 mm; 5  $\mu\text{m}$ ). Eluce byla prováděna gradientově se dvěma mobilními fázemi, viz kapitoly 4.4.1 a 4.4.2. Průběh gradientové eluce byl popsán v kapitole 4.4.2. Každý vzorek byl měřen třikrát. Obsah polyfenolických látek byl vypočten dle kalibrační křivky pro jednotlivé standardy a přepočten na 100 g čerstvých čajových lístků.

#### 6.1.2.1 Výsledky měření pro vzorek zeleného čaje

V tabulce 20 jsou uvedeny retenční časy naměřených polyfenolických látek ve vzorku zeleného čaje. Dále jsou uvedeny výsledky měření obsahu polyfenolických látek ve vzorku zeleného čaje.

Tab. 20: Retenční časy polyfenolických látek v zeleném čaji [min]

Kys. gallová	2,98	Kys. kumarová	14,38
Theofylin	4,89	Kys. ferulová	18,03
Katechin	6,94	Kys. sinapová	18,86
Kofein	8,72	Rutin	21,07

Tab. 21: Obsah kyseliny gallové v zeleném čaji

Plocha píku [mAU.s]	Koncentrace [ $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ]	Koncentrace [ $\text{mg.100g}^{-1}$ ]
18059,03	21,674	108,370
17621,89	21,137	105,685
17711,68	21,247	106,235
		$\bar{x} = 106,763$

Obsah kyseliny gallové v zeleném čaji:  $106,763 \pm 1,418 \text{ mg.100g}^{-1}$

Směrodatná odchylka:  $s = 1,418 \text{ mg.100g}^{-1}$

První měření neposkytlo uspokojivé výsledky pro theofylin. K vyhodnocení obsahu theofylinu bylo proto použito pouze druhé a třetí měření.

Tab. 22: Obsah theofylinu v zeleném čaji

Plocha píku [mAU.s]	Koncentrace [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	Koncentrace [ $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ]
1399,61	1,624	8,120
1402,41	1,627	8,135
		$\bar{x} = 8,128$

Obsah theofylinu v zeleném čaji:  $8,128 \pm 0,004 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$

Směrodatná odchylka:  $s = 0,004 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$

První měření neposkytlo uspokojivé výsledky pro katechin. K vyhodnocení obsahu katechinu bylo proto použito pouze druhé a třetí měření.

Tab. 23: Obsah katechinu v zeleném čaji

Plocha píku [mAU.s]	Koncentrace [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	Koncentrace [ $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ]
22574,10	18,134	90,670
22488,35	18,069	90,345
		$\bar{x} = 90,508$

Obsah katechinu v zeleném čaji:  $90,508 \pm 0,233 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$

Směrodatná odchylka:  $s = 0,233 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$



Tab. 24: Obsah kofeinu v zeleném čaji

Plocha píku [mAU.s]	Koncentrace [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	Koncentrace [ $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ]
503599,63	337,485	1 687,425
502223,53	336,564	1 682,820
501861,64	336,321	1 681,605
		$\bar{x} = 1683,950$

Obsah kofeinu v zeleném čaji:  $1\,683,950 \pm 3,070 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$

Směrodatná odchylka:  $s = 3,070 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$

Tab. 25: Obsah kyseliny kumarové v zeleném čaji

Plocha píku [mAU.s]	Koncentrace [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	Koncentrace [ $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ]
13008,43	32,715	163,575
13446,11	33,746	168,730
13498,37	33,869	169,345
		$\bar{x} = 167,217$

Obsah kyseliny kumarové v zeleném čaji:  $167,217 \pm 3,169 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$

Směrodatná odchylka:  $s = 3,169 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$

První měření neposkytlo uspokojivé výsledky pro kyselinu ferulovou. K vyhodnocení obsahu kyseliny ferulové bylo proto použito pouze druhé a třetí měření.

Tab. 26: Obsah kys. ferulové v zeleném čaji

Plocha píku [mAU.s]	Koncentrace [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	Koncentrace [ $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ]
20078,10	22,434	112,170
20317,54	22,736	113,680
		$\bar{x} = 112,925$

Obsah kyseliny ferulové v zeleném čaji:  $112,925 \pm 1,068 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$

Směrodatná odchylka:  $s = 1,068 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$

Tab. 27: Obsah kys. sinapové v zeleném čaji

Plocha píku [mAU.s]	Koncentrace [ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ]	Koncentrace [ $\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ]
6736,78	13,079	65,395
6617,50	12,867	64,335
6624,07	12,879	64,395
		$\bar{x} = 64,708$

Obsah kyseliny sinapové v zeleném čaji:  $64,708 \pm 0,595 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$

Směrodatná odchylka:  $s = 0,595 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$

První měření neposkytlo uspokojivé výsledky pro rutin. K vyhodnocení obsahu rutinu bylo proto použito pouze druhé a třetí měření.

Tab. 28: Obsah rutinu v zeleném čaji

Plocha píku [mAU.s]	Koncentrace [ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ]	Koncentrace [ $\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ]
33948,42	51,967	259,835
34160,20	52,289	261,445
		$\bar{x} = 260,640$

Obsah rutinu v zeleném čaji:  $260,640 \pm 1,138 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$

Směrodatná odchylka:  $s = 1,138 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$

6.1.2.2 *Výsledky měření pro vzorek bílého čaje*

V tabulce 29 jsou uvedeny retenční časy naměřených polyfenolických látek ve vzorku bílého čaje. Dále jsou uvedeny výsledky měření obsahu polyfenolických látek ve vzorku bílého čaje.

Tab. 29: *Retenční časy polyfenolických látek v bílém čaji [min]*

Kys. gallová	2,99	Kys. kumarová	14,41
Theofylin	4,86	Kys. kávová	9,28
Katechin	6,95	Kys. sinapová	18,87
Kofein	8,69	Rutin	21,11

Tab. 30: *Obsah kyseliny gallové v bílém čaji*

<b>Plocha píku [mAU.s]</b>	<b>Koncentrace [<math>\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}</math>]</b>	<b>Koncentrace [<math>\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}</math>]</b>
60071,57	73,305	366,525
61692,61	75,297	376,485
60276,00	73,556	367,780
		$\bar{x} = 370,263$

Obsah kyseliny gallové v bílém čaji:  $370,263 \pm 6,699 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$

Směrodatná odchylka:  $s = 6,699 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$

Tab. 31: *Obsah theofylinu v bílém čaji*

<b>Plocha píku [mAU.s]</b>	<b>Koncentrace [<math>\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}</math>]</b>	<b>Koncentrace [<math>\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}</math>]</b>
15541,50	12,070	60,350
15606,61	12,118	60,590
15579,09	12,098	60,490
		$\bar{x} = 60,477$

Obsah theofylinu v bílém čaji:  $60,477 \pm 0,115 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$

Směrodatná odchylka:  $s = 0,115 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$

Tab. 32: Obsah katechinu v bílém čaji

Plocha píku [mAU.s]	Koncentrace [ $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ]	Koncentrace [ $\text{mg.100g}^{-1}$ ]
3467,48	3,788	18,940
3548,94	3,849	19,245
3542,14	3,844	19,222
		$\bar{x} = 19,136$

Obsah katechinu v bílém čaji:  $19,136 \pm 0,169 \text{ mg.100g}^{-1}$

Směrodatná odchylka:  $s = 0,169 \text{ mg.100g}^{-1}$

Tab. 33: Obsah kofeinu v bílém čaji

Plocha píku [mAU.s]	Koncentrace [ $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ]	Koncentrace [ $\text{mg.100g}^{-1}$ ]
796 529,74	533,714	2 669,375
797 518,04	534,376	2 671, 880
796 770,71	533,875	2 669,375
		$\bar{x} = 2670,210$

Obsah kofeinu v bílém čaji:  $2 670,210 \pm 1,146 \text{ mg.100g}^{-1}$

Směrodatná odchylka:  $s = 1,146 \text{ mg.100g}^{-1}$

Tab. 34: Obsah kyseliny kumarové v bílém čaji

Plocha píku [mAU.s]	Koncentrace [ $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ]	Koncentrace [ $\text{mg.100g}^{-1}$ ]
1389,59	5,352	26,760
1248,71	5,021	25,105
1482,28	5,570	27,854
		$\bar{x} = 26,573$

Obsah kyseliny kumarové v bílém čaji:  $26,573 \pm 1,384 \text{ mg.100g}^{-1}$

Směrodatná odchylka:  $s = 1,384 \text{ mg.100g}^{-1}$

Tab. 35: Obsah kyseliny sinapové v bílém čaji

Plocha píku [mAU.s]	Koncentrace [ $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ]	Koncentrace [ $\text{mg.100g}^{-1}$ ]
4856,02	9,737	48,685
4885,51	9,790	48,950
4890,16	9,797	48,987
		$\bar{x} = 48,874$

Obsah kyseliny sinapové v bílém čaji:  $48,874 \pm 0,165 \text{ mg.100g}^{-1}$

Směrodatná odchylka:  $s = 0,165 \text{ mg.100g}^{-1}$

Tab. 36: Obsah rutinu v bílém čaji

Plocha píku [mAU.s]	Koncentrace [ $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ]	Koncentrace [ $\text{mg.100g}^{-1}$ ]
9061,07	14,085	70,426
9060,65	14,084	70,423
9059,66	14,083	70,415
		$\bar{x} = 70,421$

Obsah rutinu v bílém čaji:  $70,421 \pm 0,008 \text{ mg.100g}^{-1}$

Směrodatná odchylka:  $s = 0,008 \text{ mg.100g}^{-1}$

6.1.2.3 *Výsledky měření pro vzorek černého čaje*

V tabulce 37 jsou uvedeny retenční časy naměřených polyfenolických látek ve vzorku černého čaje. Dále jsou uvedeny výsledky měření obsahu polyfenolických látek ve vzorku černého čaje.

Tab. 37: *Retenční časy polyfenolických látek v černém čaji [min]*

Kys. gallová	2,99	Kys. kumarová	14,63
Theofylin	4,87	Kys. kávová	18,03
Katechin	6,96	Kys. sinapová	18,88
Kofein	8,71	Rutin	21,11
EGC	5,93		

První měření neposkytlo uspokojivé výsledky pro kyselinu gallovou. K vyhodnocení obsahu kyseliny gallové bylo proto použito pouze druhé a třetí měření.

Tab. 38: *Obsah kyseliny gallové v černém čaji*

Plocha píku [mAU.s]	Koncentrace [ $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ]	Koncentrace [ $\text{mg.100g}^{-1}$ ]
94649,08	115,799	578,995
94812,16	115,999	579,995
		$\bar{x} = 579,495$

Obsah kyseliny gallové v černém čaji:  $579,495 \pm 0,707 \text{ mg.100g}^{-1}$

Směrodatná odchylka:  $s = 0,707 \text{ mg.100g}^{-1}$

Tab. 39: *Obsah theofylinu v černém čaji*

Plocha píku [mAU.s]	Koncentrace [ $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ]	Koncentrace [ $\text{mg.100g}^{-1}$ ]
72196,31	53,915	269,575
72001,30	53,771	268,855
72038,59	53,799	268,994
		$\bar{x} = 269,141$

Obsah theofylinu v černém čaji:  $269,141 \pm 0,508 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$

Směrodatná odchylka:  $s = 0,508 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$

*Tab. 40: Obsah katechinu černém čaji*

Plocha píku [mAU.s]	Koncentrace [ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ]	Koncentrace [ $\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ]
17952,12	14,663	73,315
17870,86	14,602	73,010
18136,96	14,802	74,011
		$\bar{x} = 73,445$

Obsah katechinu v černém čaji:  $73,445 \pm 0,514 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$

Směrodatná odchylka:  $s = 0,514 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$

*Tab. 41: Obsah kofeinu v černém čaji*

Plocha píku [mAU.s]	Koncentrace [ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ]	Koncentrace [ $\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ]
622328,04	417,019	2085,095
622386,34	417,058	2085,290
622142,51	416,895	2084,476
		$\bar{x} = 2084,954$

Obsah kofeinu v černém čaji:  $2084,954 \pm 0,425 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$

Směrodatná odchylka:  $s = 0,425 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$

Tab. 42: Obsah kyseliny kumarové v černém čaji

Plocha píku [mAU.s]	Koncentrace [ $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ]	Koncentrace [ $\text{mg.100g}^{-1}$ ]
2494,59	7,955	39,775
2512,93	7,998	39,990
2545,71	8,075	40,376
		$\bar{x} = 40,047$

Obsah kyseliny kumarové v černém čaji:  $40,047 \pm 0,305 \text{ mg.100g}^{-1}$

Směrodatná odchylka:  $s = 0,305 \text{ mg.100g}^{-1}$

Tab. 43: Obsah kyseliny sinapové v černém čaji

Plocha píku [mAU.s]	Koncentrace [ $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ]	Koncentrace [ $\text{mg.100g}^{-1}$ ]
2941,91	6,336	31,680
2944,32	6,340	31,700
2906,02	6,272	31,360
		$\bar{x} = 31,580$

Obsah kyseliny sinapové v černém čaji:  $31,580 \pm 0,191 \text{ mg.100g}^{-1}$

Směrodatná odchylka:  $s = 0,191 \text{ mg.100g}^{-1}$

Tab. 44: Obsah rutinu v černém čaji

Plocha píku [mAU.s]	Koncentrace [ $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ]	Koncentrace [ $\text{mg.100g}^{-1}$ ]
10869,79	16,838	84,190
10915,55	16,908	84,540
10953,18	16,965	84,826
		$\bar{x} = 84,519$

Obsah rutinu v černém čaji:  $84,519 \pm 0,318 \text{ mg.100g}^{-1}$

Směrodatná odchylka:  $s = 0,318 \text{ mg.100g}^{-1}$



Tab. 45: Obsah EGC v černém čaji

Plocha píku [mAU.s]	Koncentrace [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	Koncentrace [ $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ]
112074,72	89,857	449,285
111825,67	89,660	448,300
111877,01	89,700	448,502
		$\bar{x} = 448,696$

Obsah EGC v černém čaji:  $448,696 \pm 0,520 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$

Směrodatná odchylka:  $s = 0,520 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$

## 6.2 Metoda HPLC/MS

Pomocí hmotnostní detekce s využitím vhodného software pro identifikaci látek podle jejich  $m/z$  lze získat podstatně přesnější kvalitativní analýzu než pomocí samotné HPLC a po příslušné kalibraci pomocí čistých standardů by rovněž byla možná kvantitativní analýza. Metodu HPLC/MS však nebylo možné v časovém úseku stanoveném pro diplomovou práci využít ke kompletní analýze a kvantifikaci individuálních polyfenolických látek ve všech typech analyzovaných čajů.

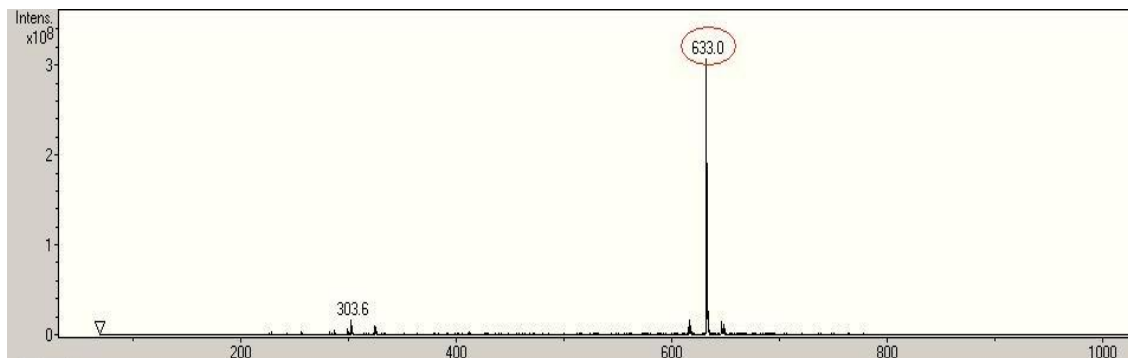
Tab. 46: Přehled standardů a jejich molekulových hmotností

Rutin	610	Kys. kumarová	164
Katechin	290	Kys. kávová	180
Theofylin	180	Kys. sinapová	224
Kofein	194	EC	290
Resveratrol	228	EGC	306
Kys. gallová	170	ECG	442
Kys. ferulová	194	EGCG	458

V následujících podkapitolách jsou znázorněny spektra jednotlivých standardů, které se posléze podařilo nalézt v hmotnostních spektrech vzorků čajů. Některé standardy bylo možné identifikovat jak v kladném tak v záporném módu, bohužel se to nepodařilo u všech.

### 6.2.1 Hmotnostní spektra rutinu

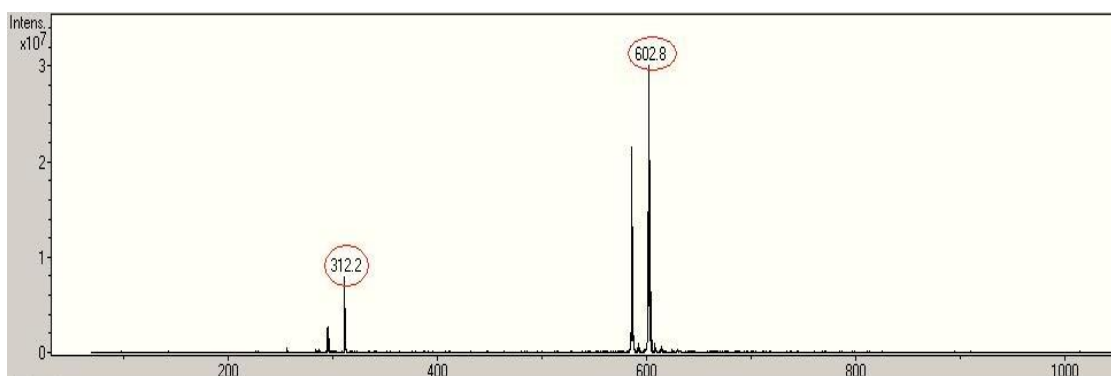
Ve spektru v pozitivním módu byl nalezen hlavní fragment 633,0, který je dominantní (obr. 43). S největší pravděpodobností lze usuzovat, že na molekulu rutinu (610 Da) byl navázán iont Na (23 Da).



Obr. 43: Hmotnostní spektrum rutinu v pozitivním módu

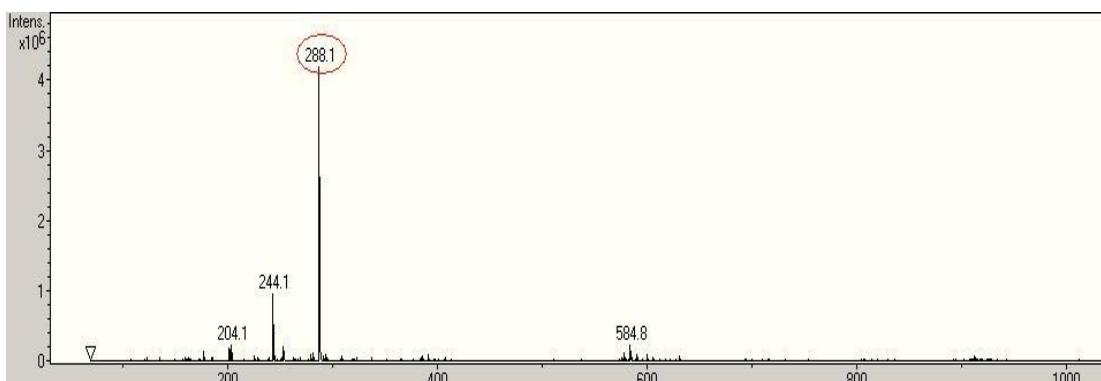
### 6.2.2 Hmotnostní spektra EC

Ve spektru v pozitivním módu byl nalezen hlavní fragment 602,8, který je dominantní (obr.44). S největší pravděpodobností lze usuzovat, že došlo ke spojení dvou molekul EC a k následnému navázání iontu Na (23 Da). Dalším dominantním fragmentem je štep 312,2, který představuje navázání iontu Na na molekulu EC.



Obr. 44: Hmotnostní spektrum EC v pozitivním módu

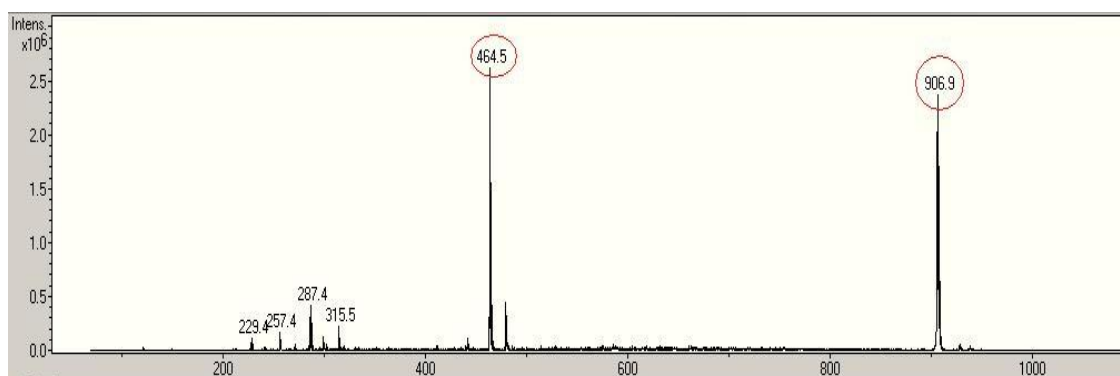
V negativním módu je EC ionizován odštěpením vodíku, ve spektru (obr. 45) je tak patrný jako záporně nabitý ion s  $m/z$  288,1.



Obr. 45: Hmotnostní spektrum EC v negativním módu

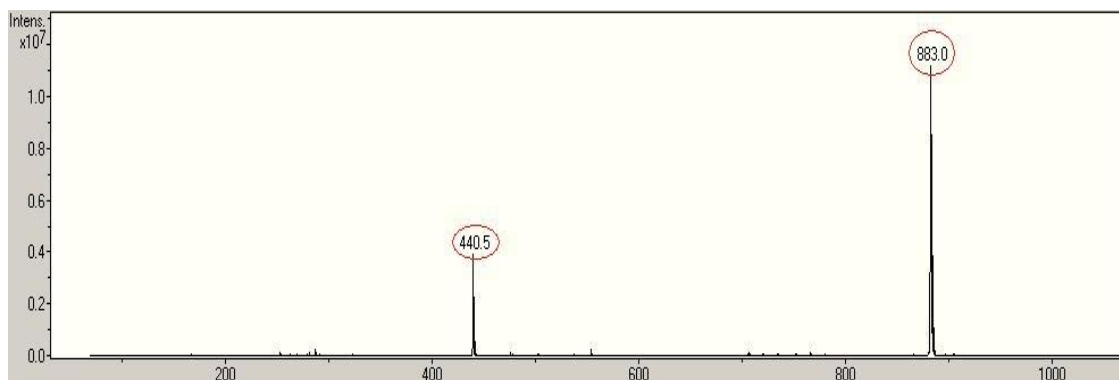
### 6.2.3 Hmotnostní spektra ECG

Ve spektru v pozitivním módu byl nalezen hlavní fragment 464,5, který je dominantní (obr. 46). S největší pravděpodobností lze usuzovat, že došlo k navázání iontu Na (23 Da). Dalším dominantním fragmentem je štěp 906,9, který představuje spojení dvou molekul a následné navázání Na.



Obr. 46: Hmotnostní spektrum ECG v pozitivním módu

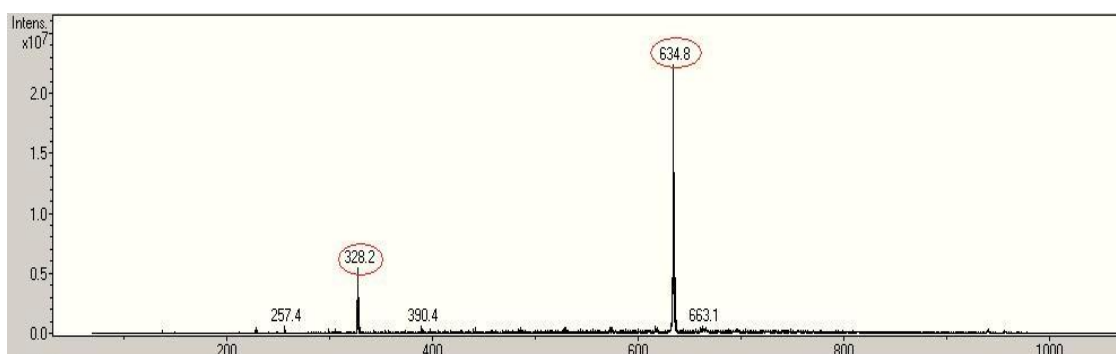
V negativním módu byl identifikován hlavní fragment 883,0 (obr. 47), což nasvědčuje, že došlo ke spojení dvou molekul ECG. Dalším významným fragmentem je štěp 440,5, který je výsledkem odštěpení vodíku.



Obr. 47: Hmotnostní spektrum EGC v negativním módu

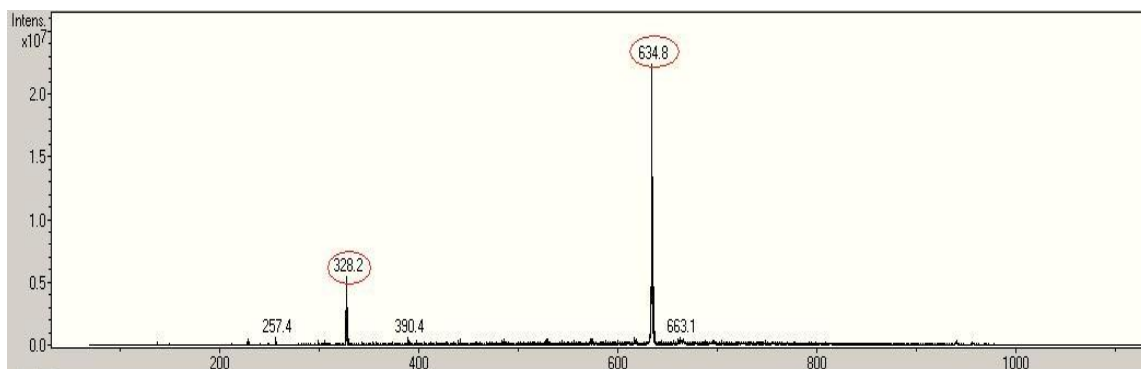
#### 6.2.4 Hmotnostní spektra EGC

Ve spektru v pozitivním módu byl nalezen hlavní fragment 634,8, který je dominantní (obr. 48). S největší pravděpodobností lze usuzovat, že došlo ke spojení dvou molekul EGC a k následnému navázání iontu Na (23 Da). Dalším dominantním fragmentem je štěp 328,2, který představuje navázání iontu Na na molekulu EGC.



Obr. 48: Hmotnostní spektrum EGC v pozitivním módu

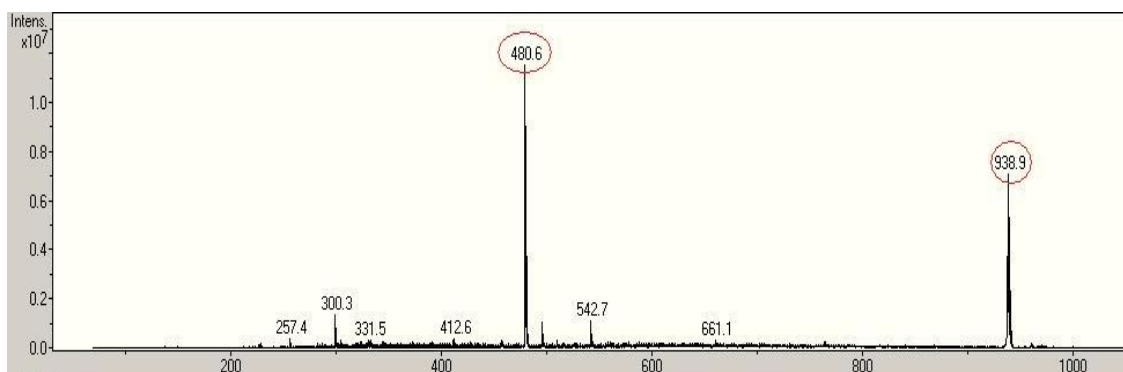
V negativním módu byl identifikován hlavní fragment 304,3 a 610,8 (obr. 49), což nasvědčuje tomu, že byl EGC ionizován za odštěpení vodíku.



Obr. 49: Hmotnostní spektrum EGC v negativním módu

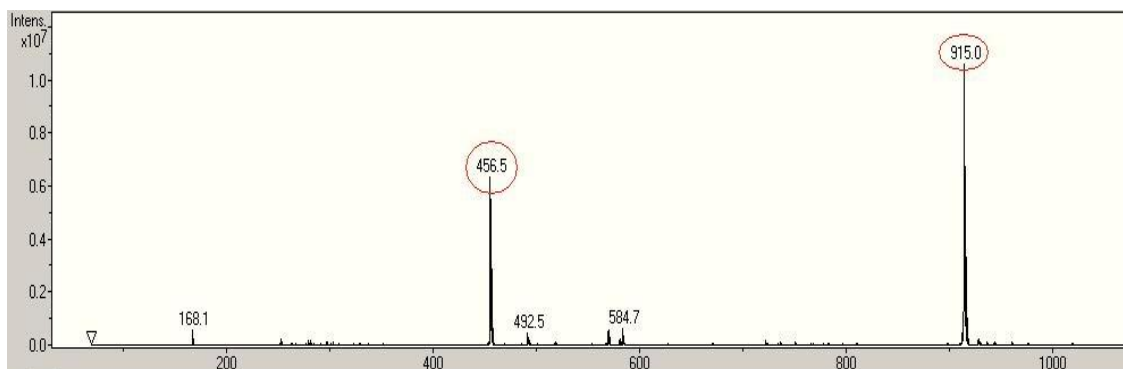
### 6.2.5 Hmotnostní spektra EGCG

Ve spektru v pozitivním módu byl nalezen hlavní fragment 480,6, který je dominantní (obr. 50). S největší pravděpodobností lze usuzovat, že došlo k navázání iontu Na (23 Da) na molekulu EGCG. Dalším dominantním fragmentem je štěp 938,9, který představuje spojení dvou molekul a následné navázání Na.



Obr. 50: Hmotnostní spektrum EGCG v pozitivním módu

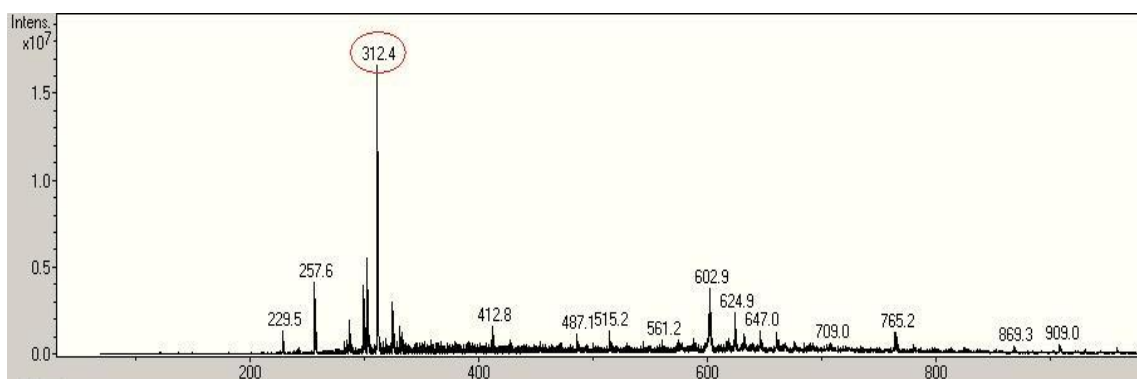
V negativním módu byl identifikován hlavní fragment 915,0 (obr. 51), což nasvědčuje, že došlo ke spojení dvou molekul EGCG. Dalším významným fragmentem je štěp 456,5.



Obr. 51: Hmotnostní spektrum EGCG v negativním módu

### 6.2.6 Hmotnostní spektrum katechinu

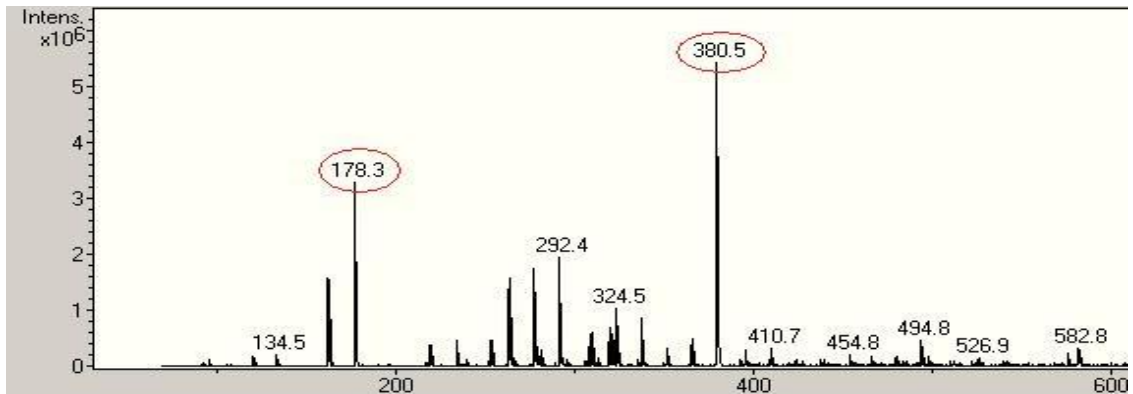
Ve spektru v pozitivním módu byl nalezen hlavní fragment 312,4, který je dominantní (obr. 52). S největší pravděpodobností lze usuzovat, že došlo k navázání iontu Na (23 Da) na molekulu katechinu.



Obr. 52: Hmotnostní spektrum katechinu v pozitivním módu

### 6.2.7 Hmotnostní spektrum theofylinu

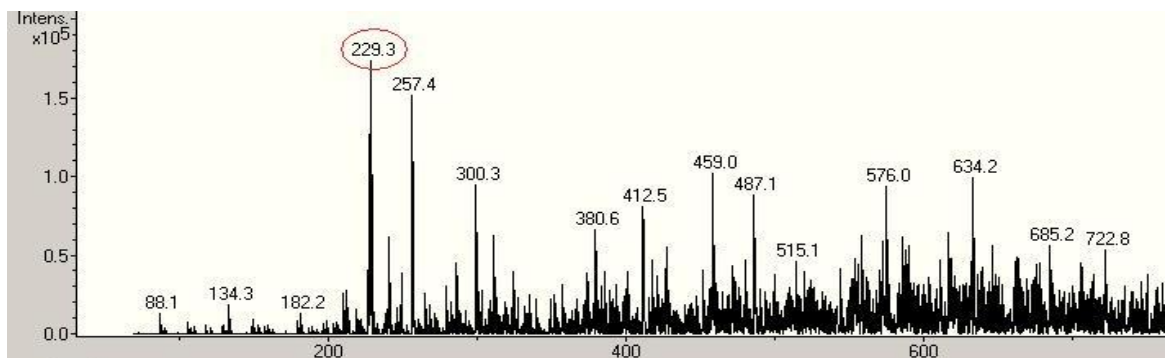
U theofylinu byl k identifikaci iontu zvolen negativní mód, jelikož pozitivní mód neposkytl uspokojující výsledky. Ve spektru v negativním módu byl nalezen fragment 178,3 a 380,5, (obr. 53). S největší pravděpodobností lze usuzovat, že v případě čáry 380,5 došlo ke spojení dvou molekul theofylinu a k navázání iontu Na (23 Da).



Obr. 53: Hmotnostní spektrum theofylinu v negativním módu

### 6.2.8 Hmotnostní spektrum resveratrolu

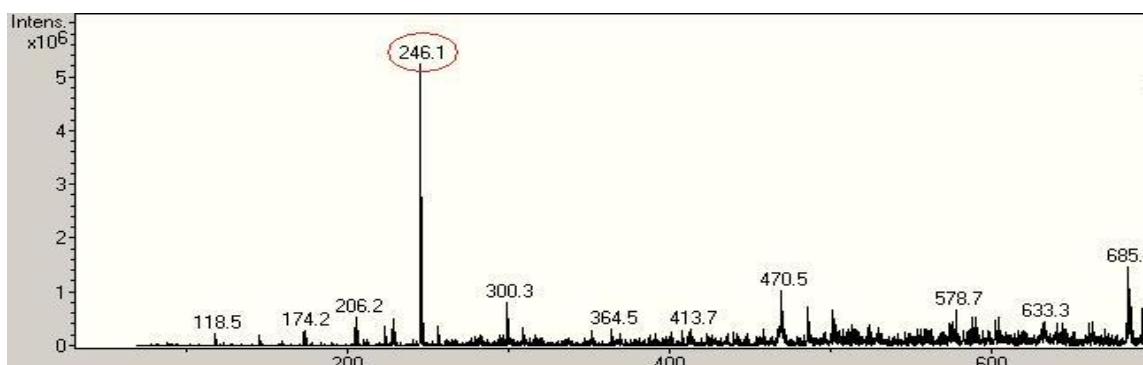
Ve spektru v pozitivním módu byl nalezen fragment 229,3 (obr. 54).



Obr. 54: Hmotnostní spektrum resveratrolu v pozitivním módu

### 6.2.9 Hmotnostní spektrum kyseliny sinapové

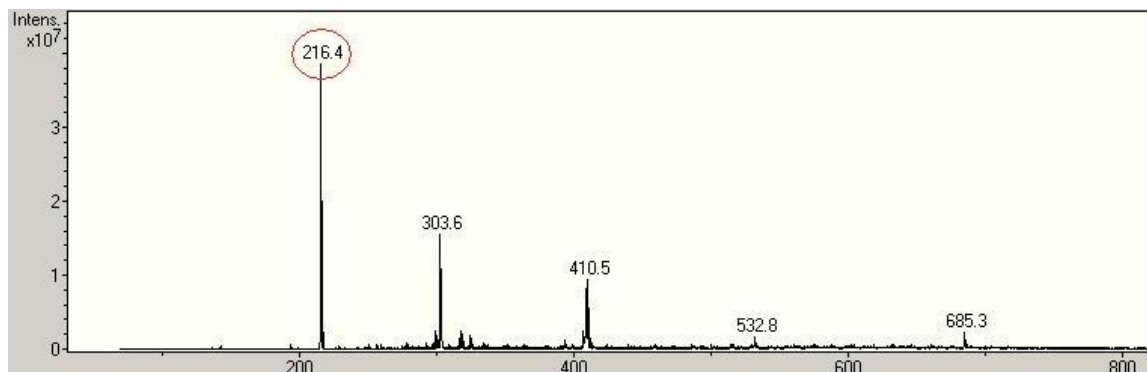
Ve spektru v pozitivním módu byl nalezen fragment 246,1 (obr. 55).



Obr. 55. Hmotnostní spektrum kyseliny sinapové v pozitivním módu

### 6.2.10 Hmotnostní spektrum kofeinu

Ve spektru v pozitivním módu byl nalezen hlavní fragment 216,4, který je dominantní (obr. 56). S největší pravděpodobností lze usuzovat, že došlo k navázání iontu Na (23 Da) na molekulu kofeinu.

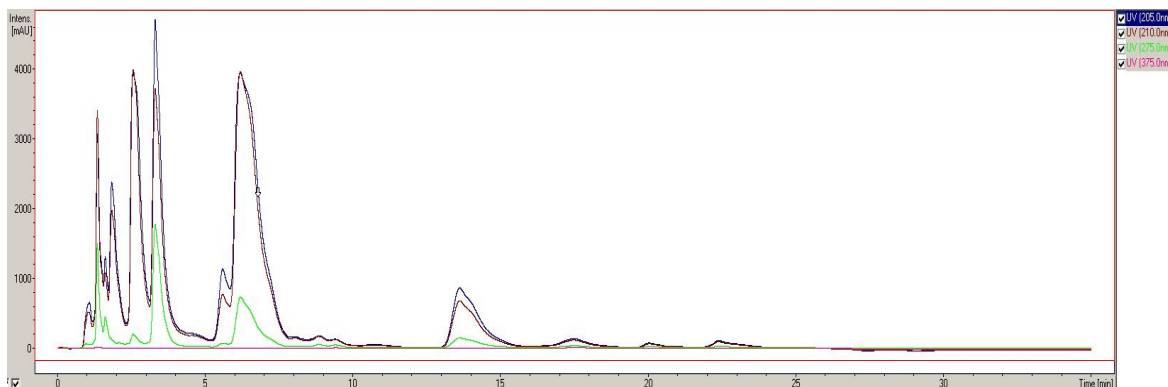


Obr. 56: Hmotnostní spektrum kofeinu v pozitivním módu

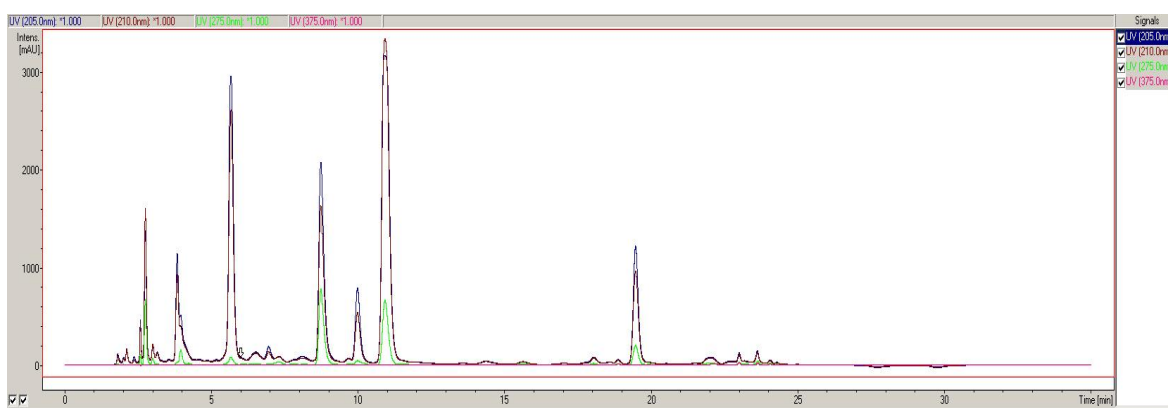
### 6.2.11 HPLC/MS analýza vzorku zeleného čaje

Nejdříve byl vzorek podroben separaci pomocí HPLC s UV – VIS detekcí. První pokusy o separaci vzorku byly prováděny na koloně Dionex Aclaim (150 mm x 2,1 mm, 5  $\mu$ m). Eluce byla prováděna gradientově se dvěma mobilními fázemi, viz kapitoly 4.4.1 a 4.4.2. Průběh gradientové eluce byl popsán v kapitole 4.4.2. Separace probíhala při teplotě 30°C a tlaku cca 80 bar. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,5 ml.min<sup>-1</sup>. Doba separace byla nastavena na 35 minut. Výsledkem dělení je chromatogram na obr. 57. Z chromatogramu je zřejmé, že dělení neproběhlo úspěšně. Proto byla provedena výměna kolony. Kolona Dionex byla nahrazena kolonou Watrex (250 mm x 4,0 mm; 5  $\mu$ m). Podmínky separace byly stejné jako u předchozí kolony. Výsledkem dělení na koloně Watrex je chromatogram na obr. 58. Z chromatogramu je patrné, že dělení proběhlo poměrně úspěšně. K separaci dalších vzorků byla využívána již jen kolona Watrex.





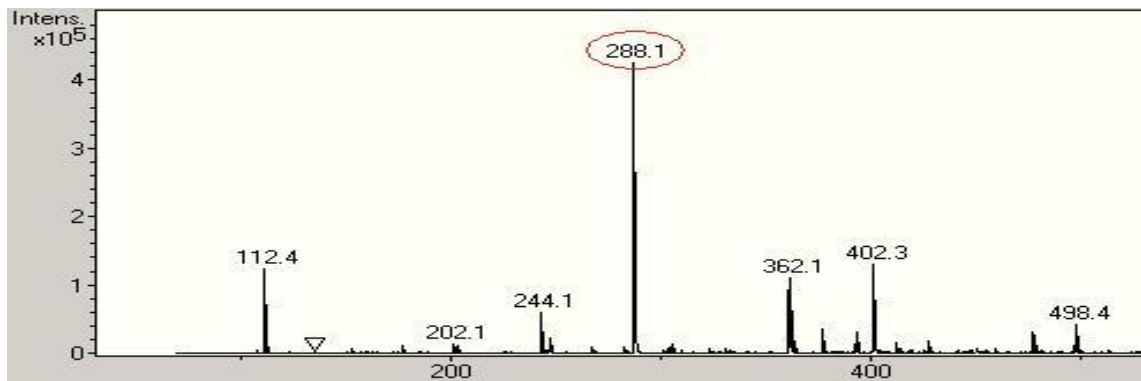
Obr. 57: Chromatogram zeleného čaje – kolona Dionex



Obr. 58: Chromatogram zeleného čaje – kolona Watrex

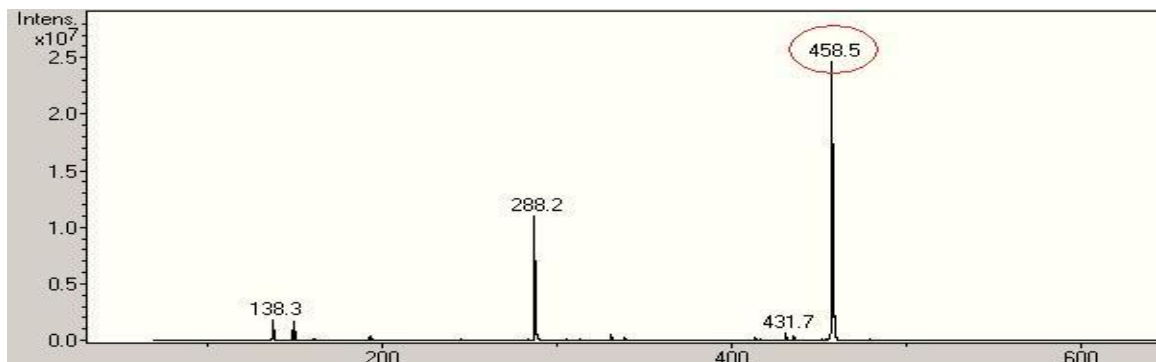
Ze spektra vzorku zeleného čaje v pozitivním módu byly vybrány jednotlivé fragmenty, ve kterých jsou ve významném množství patrné ionty standardů, viz obr. 59 – 63. Záměrně byl vybrán pozitivní mód, jelikož jsou v něm ionty lépe identifikovatelné.

Ve spektru v pozitivním módu byl identifikován iont katechinu. Čára 288,1 (obr. 59) odpovídá dominantní čáře iontu s  $m/z$  312,4 ve spektru na obr. 52, kde byl na molekulu katechinu navázán Na.



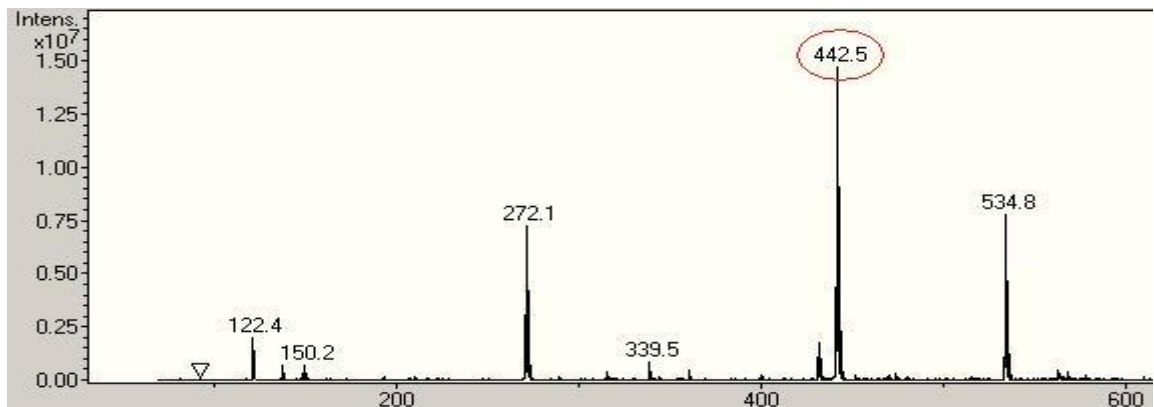
Obr. 59: Spektrum EC v zeleném čaji

Ve spektru v pozitivním módu byl identifikován iont EGCG. Čára 458,5 (obr. 60) odpovídá dominantní čáře iontu s  $m/z$  480,6 ve spektru na obr. 50, kde byl na molekulu katechinu navázán Na.



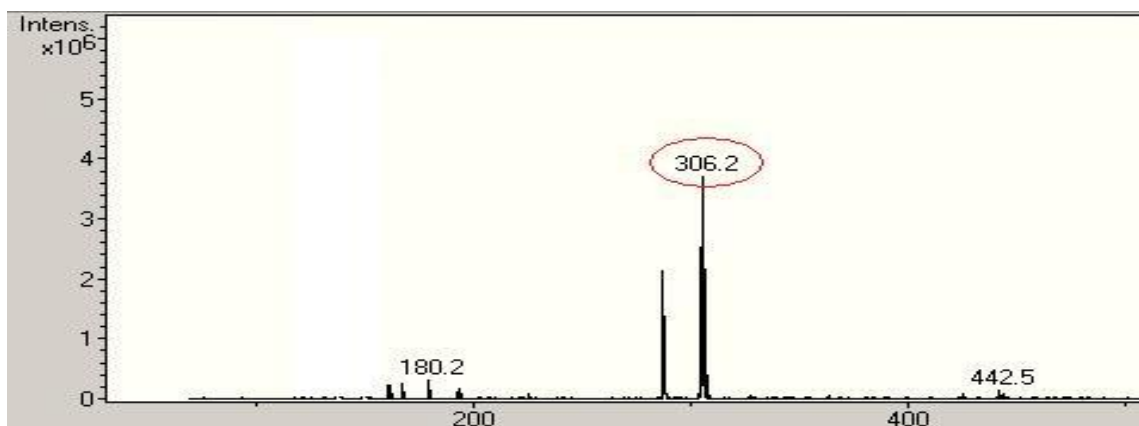
Obr. 60: Spektrum EGCG v zeleném čaji

Dalším identifikovaným iontem ve spektru vzorku zeleného čaje byl ECG. Čára 442,5 (obr. 61) odpovídá dominantní čáře iontu s  $m/z$  464,5 ve spektru na obr. 46, kde byl na molekulu ECG navázán Na.



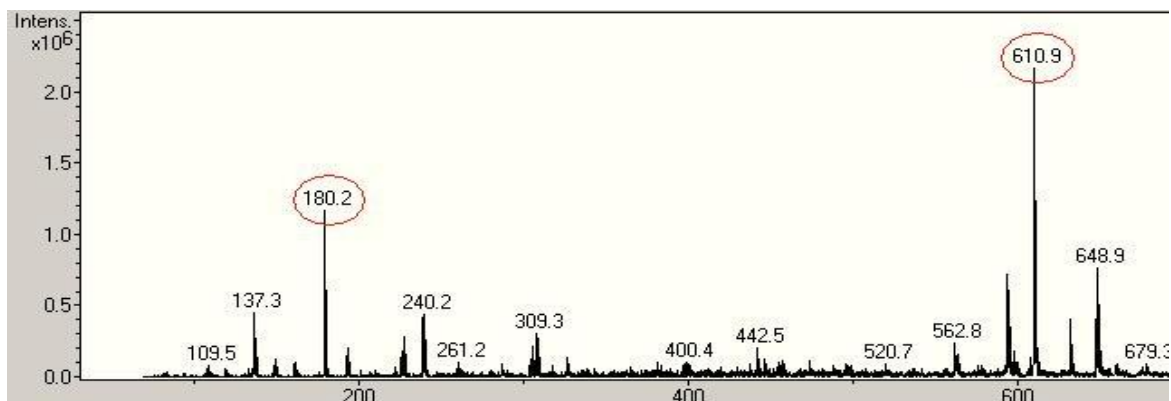
Obr. 61: Spektrum EGC v zeleném čaji

Dalším identifikovaným iontem ve spektru v pozitivním módu byl EGC. Čára 306,2 (obr. 62) odpovídá dominantní čáře iontu s  $m/z$  328,2 ve spektru na obr. 48, kde byl na molekulu EGC navázán Na.



Obr. 62: Spektrum EGC v zeleném čaji

Dalšími identifikovanými ionty ve spektru v pozitivním módu byl theofylin a rutin. Na obr. 63 jsou patrné dominantní čáry 180,2 (teofylin) a 610,9 (rutin).



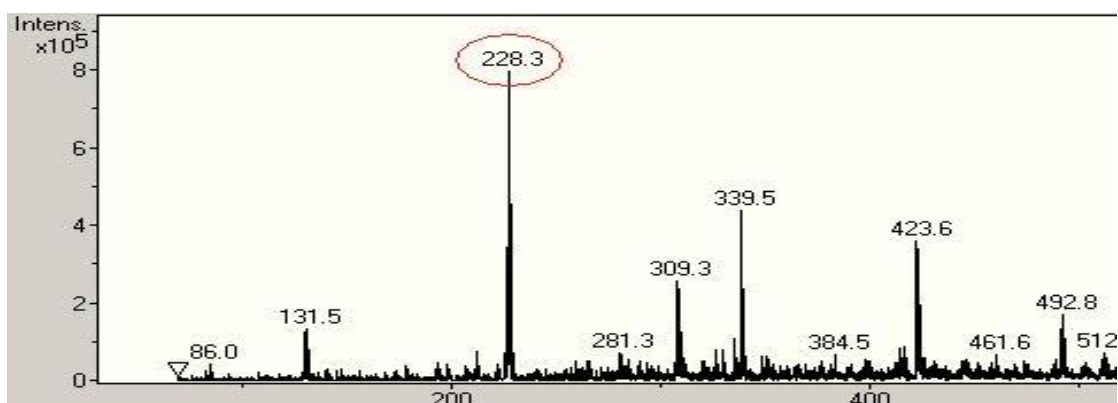
Obr. 63: Spektrum rutinu a theofylinu v zeleném čaji

### 6.2.12 HPLC/MS analýza vzorku bílého čaje

Vzorek byl připraven a analyzován způsobem popsáním v kapitole 5.5.4.

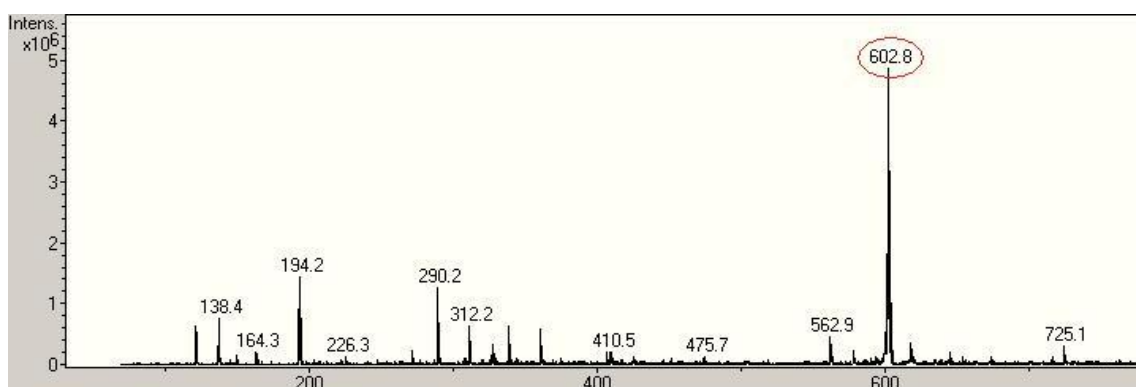
Ze spektra vzorku bílého čaje v pozitivním módu byly vybrány jednotlivé fragmenty, ve kterých jsou ve významném množství patrné ionty standardů, viz obr. 64 – 68. Záměrně byl také u tohoto vzorku vybrán pozitivní mód, jelikož jsou v něm ionty lépe identifikovatelné.

Ve spektru v pozitivním módu byl identifikován iont resveratrolu. Čára 228,3 (obr. 64) odpovídá dominantní čáře iontu s  $m/z$  229,3 ve spektru na obr. 54.



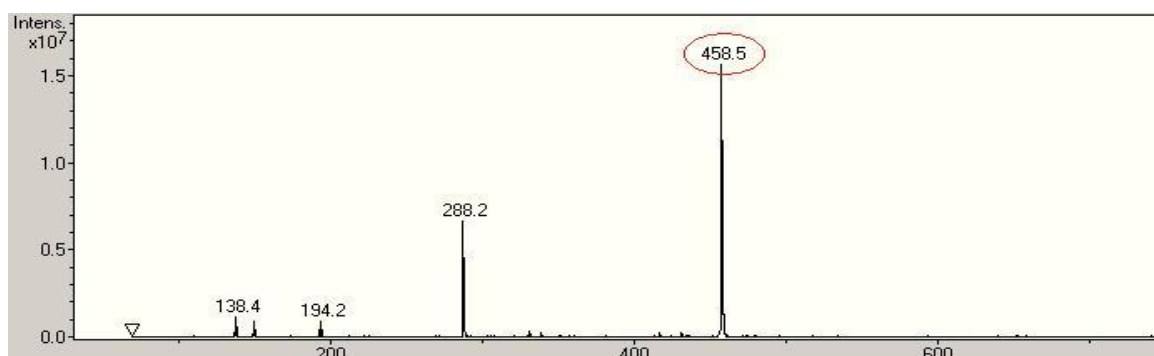
Obr. 64: Spektrum resveratrolu v bílém čaji

Ve spektru v pozitivním módu byl identifikován iont EC. Čára 602,8 (obr. 65) odpovídá dominantní čáře iontu s  $m/z$  602,8 ve spektru na obr. 44.



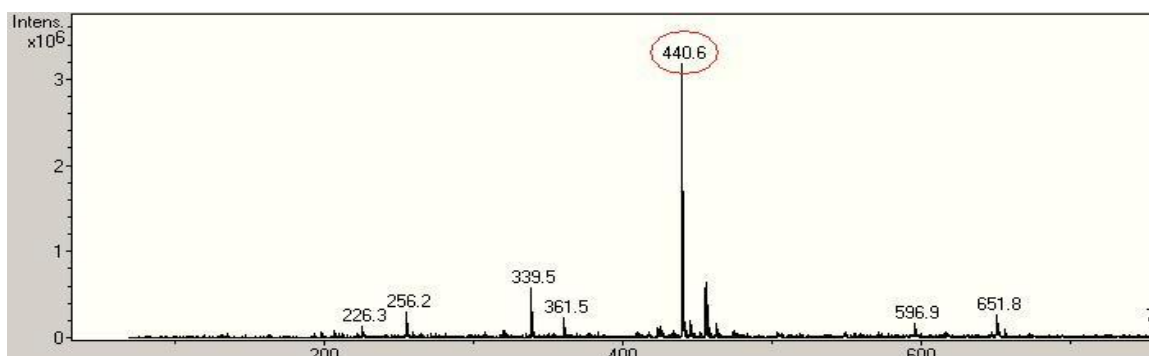
Obr. 65: EC v bílém čaji

Ve spektru v pozitivním módu byl identifikován iont EGCG. Čára 458,5 (obr. 66) odpovídá dominantní čáře iontu s  $m/z$  480,6 ve spektru na obr. 50, kde byl na EGCG navázán Na.



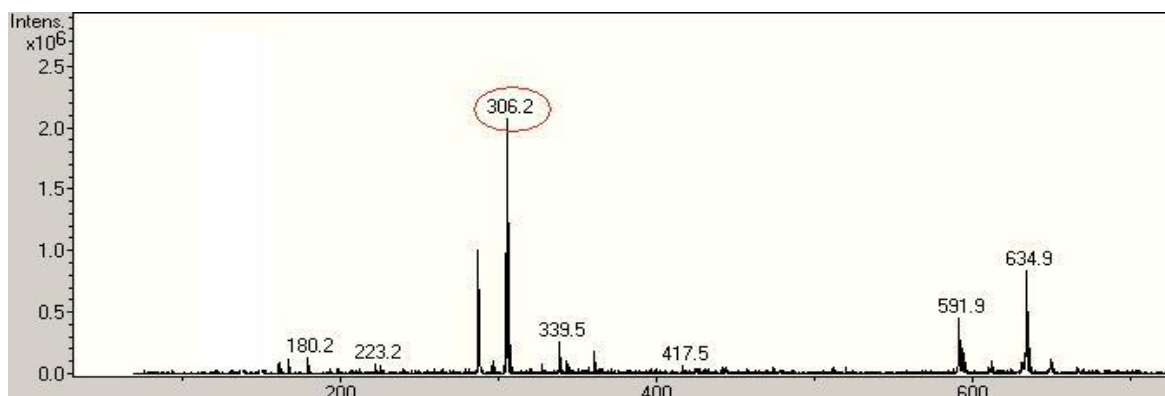
Obr. 66: Spektrum EGCG v bílém čaji

Ve spektru v pozitivním módu byl identifikován iont EGC. Čára 440,6 (obr. 67) odpovídá dominantní čáře iontu s  $m/z$  464,5 ve spektru na obr. 46, kde byl na EGC navázán Na.



Obr. 67: Spektrum EGC v bílém čaji

Ve spektru v pozitivním módu byl identifikován iont EGC. Čára 306,2 (obr. 68) odpovídá dominantní čáře iontu s  $m/z$  634,8 ve spektru na obr. 48, kde byl na 2 molekuly EGC navázán Na.



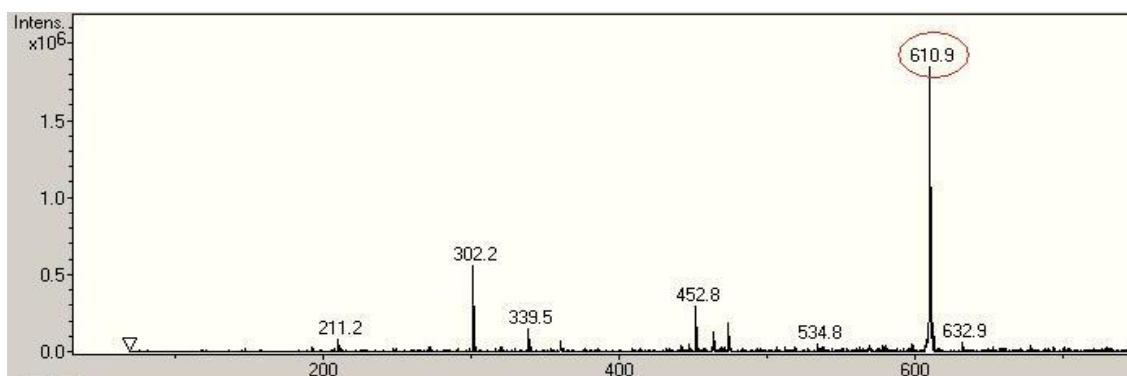
Obr. 68: Spektrum EGC v bílém čaji

### 6.2.13 HPLC/MS analýza vzorku černého čaje

Vzorek byl připraven a analyzován způsobem popsáním v kapitole 5.5.4.

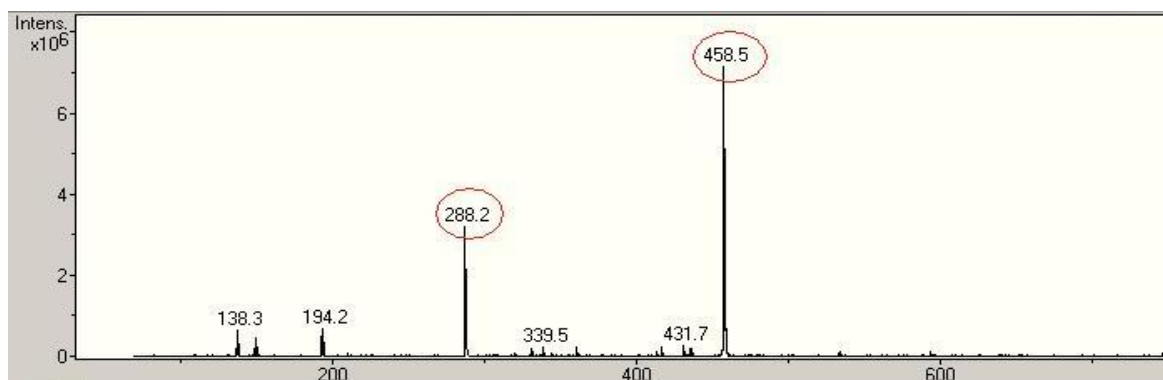
Ze spektra vzorku černého čaje v pozitivním módu byly vybrány jednotlivé fragmenty, ve kterých jsou ve významném množství patrné ionty standardů, viz obr. 69 – 72. Záměrně byl také u tohoto vzorku vybrán pozitivní mód, jelikož jsou v něm ionty lépe identifikovatelné.

Ve spektru v pozitivním módu byl identifikován iont rutinu. Čára 610,9 (obr. 69) odpovídá dominantní čáře iontu s  $m/z$  633,0 ve spektru na obr. 43, kde byl na rutin navázán Na.



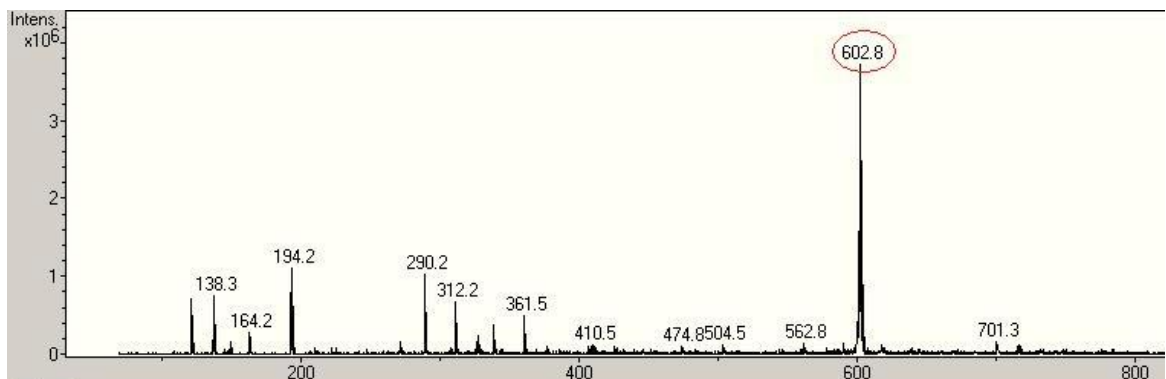
Obr. 69: Spektrum rutinu v černém čaji

Ve spektru v pozitivním módu byl identifikován iont katechinu a EGCG. Čára 458,5 (obr. 70) odpovídá dominantní čáře iontu EGCG s  $m/z$  480,6 ve spektru na obr. 50, kde byl na rutin navázán Na. Čára 288,2 odpovídá dominantní čáře iontu katechinu s  $m/z$  312,4 ve spektru na obr. 52, kde byl na katechin také navázán Na.



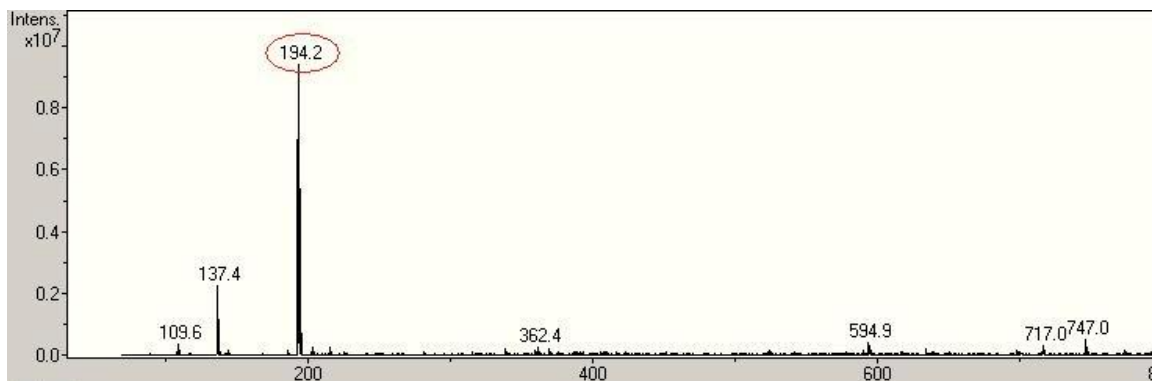
Obr. 70: Spektrum katechinu a EGCG v černém čaji

Ve spektru v pozitivním módu byl identifikován iont EC. Čára 602,8 (obr. 71) odpovídá dominantní čáře iontu s  $m/z$  602,8 ve spektru na obr. 44.



Obr. 71: Spektrum EC v černém čaji

Ve spektru v pozitivním módu byl identifikován iont kofeinu. Čára 194,2 (obr. 72) odpovídá dominantní čáře iontu kofeinu s  $m/z$  216,4 ve spektru na obr. 56, kde byl na kofein navázán Na.



Obr. 72: Spektrum kofeinu v černém čaji



## ZÁVĚR

Hlavním cílem této diplomové práce bylo vyvinout a ověřit metodiku pro stanovení polyfenolických látek. Z potravin, které jsou vhodnou matricí pro stanovení polyfenolů, byly vybrány čaje. Nejdříve byla použita metoda HPLC s UV – VIS detekcí, eluce probíhala gradientově za tlaku cca 160 bar. Byly použity dvě mobilní fáze: mobilní fáze A o složení deionizovaná voda, acetonitril, kyselina trifluoroctová v poměru 95:5:0,35 a mobilní fáze B o složení deionizovaná voda, acetonitril, kyselina trifluoroctová (TFO) v poměru 50:50:0,25. Průtok byl nastaven na 1 ml.min<sup>-1</sup>. Absorbance byla měřena při vlnových délkách 205, 210, 275 a 375 nm. Pro vyhodnocení byla použita vlnová délka 205 nm, jelikož píky při této vlnové délce ve většině případů vykazovaly největší intenzitu, a také tato vlnová délka poskytla přesnější určení retenčních časů. Měření probíhalo na koloně Watrex (250 mm x 4,0 mm; 5 μm).

Nejvíce fenolických a polyfenolických látek bylo nalezeno v zeleném čaji Ceylon Green. Tento vzorek obsahoval 106,763 ± 1,418 mg.100g<sup>-1</sup> kyseliny gallové, 8,128 ± 0,00388 mg.100g<sup>-1</sup> theofylinu, 90,508 ± 0,233 mg.100g<sup>-1</sup> katechinu, 167,217 ± 3,169 mg.100g<sup>-1</sup> kyseliny kumarové, 112,925 ± 1,068 mg.100g<sup>-1</sup> kyseliny ferulové, 64,708 ± 0,595 mg.100g<sup>-1</sup> kyseliny sinapové, 206,640 ± 1,138 mg.100g<sup>-1</sup> rutinu a 1 683,950 ± 3,070 mg.100g<sup>-1</sup> kofeinu.

V bílém čaji Shou Mei bylo stanoveno 370,263 ± 6,699 mg.100g<sup>-1</sup> kyseliny gallové, 60,427 ± 0,115 mg.100g<sup>-1</sup> theofylinu, 19,136 ± 0,169 mg.100g<sup>-1</sup> katechinu, 26,573 ± 1,384 mg.100g<sup>-1</sup> kyseliny kumarové, 48,874 ± 0,165 mg.100g<sup>-1</sup> kyseliny sinapové, 70,421 ± 0,079 mg.100g<sup>-1</sup> rutinu a 2 670,210 ± 1, 146 mg.100g<sup>-1</sup> kofeinu.

V černém čaji Assam Clasic Blend bylo stanoveno 579,495 ± 0,707 mg.100g<sup>-1</sup> kyseliny gallové, 269,141 ± 0,508 mg.100g<sup>-1</sup> theofylinu, 73,445 ± 0,514 mg.100g<sup>-1</sup> katechinu, 40,047 ± 0,305 mg.100g<sup>-1</sup> kyseliny kumarové, 31,580 ± 0,191 mg.100g<sup>-1</sup> kyseliny sinapové, 84,519 ± 0,318 mg.100g<sup>-1</sup> rutinu, 2 084,954 ± 0,425 mg.100g<sup>-1</sup> kofeinu a 448,696 ± 0,520 mg.100g<sup>-1</sup> EGC.

Dále bylo pracováno s metodou HPLC/MS. Ve vorku zeleného čaje Ceylon Green byl identifikován EGCG, katechin, rutin, theofylin, EGC a ECG.

Ve vzorku bílého čaje Shou Mei byl identifikován EGCG, rutin, EC, EGC, ECG, resveratrol a kyselina sinapová.

Ve vzorku černého čaje Assasm Clasic byl identifikován EGCG, rutin, EC, ECG, EGC.

Nejvíce látek bylo identifikováno v zeleném čaji, stejně jako u metody HPLC.

Jelikož doba vymezená pro praktickou část diplomové práce nestačila pro kompletní analýzu vzorků, jedná se v případě hmotnostní spektrometrie pouze o kvalitativní analýzu.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] Polyfenol. Wikipedia [online]. Dostupné z <http://cs.wikipedia.org/wiki/Polyfenol> [cit. 2011-03-20]
- [2] ELEFANTOVÁ, P. *Stanovení polyfenolických látek v rostlinách.: Bakalářská práce*. Brno: MU, 2010
- [3] SLANINA, J., TÁBORSKÁ, E. Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. *Chemické listy* [online]. 2004, roč. 98 [cit. 2011-03-20], str. 239–245. Dostupné z [http://www.chemicke-listy.cz/common/article-vol\\_98-issue\\_5-page\\_239.html](http://www.chemicke-listy.cz/common/article-vol_98-issue_5-page_239.html)
- [4] TRNA, J., TÁBORSKÁ, E. Přírodní polyfenolové antioxidanty [online]. Dostupné z: <http://www.med.muni.cz/biochem/seminare/prirantiox.rtf> [cit. 2011-03-20]
- [5] HARMATHA, J. Strukturní bohatství a biologický význam lignanů a jim příbuzných rostlinných fenylpropanoidů. *Chemické listy* [online]. 2005, roč. 99 [cit. 2011-03-20], str. 622–632. Dostupné z [http://www.chemicke-listy.cz/common/article-vol\\_99-issue\\_9-page\\_622.html](http://www.chemicke-listy.cz/common/article-vol_99-issue_9-page_622.html)
- [6] ONDREJOVIČ, M., MALIARA, T., POLÍVKA, L., ŠILHÁR, S. Polyfenoly jabl'k. *Chemické listy* [online]. 2009, roč. 103 [cit. 2011-03-20], str. 394–400. Dostupné z [http://www.chemicke-listy.cz/common/article-vol\\_103-issue\\_5-page\\_394.html](http://www.chemicke-listy.cz/common/article-vol_103-issue_5-page_394.html)
- [7] Flavonoidy. Wikiknihy [online]. Dostupné z [http://cs.wikibooks.org/wiki/Přírodní\\_látky/Chemie\\_přírodních\\_látek/Přehled\\_přírodních\\_látek/Glykosidy](http://cs.wikibooks.org/wiki/Přírodní_látky/Chemie_přírodních_látek/Přehled_přírodních_látek/Glykosidy) [cit. 2011-03-20]
- [8] Rutin. Wikipedia [online]. Dostupné z <http://cs.wikipedia.org/wiki/Rutin> [cit. 2011-03-20]
- [9] DROBILOVÁ, M. *Hroznová šťáva a její využití. Bakalářská práce*, Brno: VUT, 2009
- [10] Isoflavonoidy [online]. Dostupné z [http://biomikro.vscht.cz/groups/lab255/html/isoflavonoidy\\_cz.html](http://biomikro.vscht.cz/groups/lab255/html/isoflavonoidy_cz.html) [cit. 2011-03-20]

- [11] Fytoalexiny. Agromanual [online]. Dostupné z <http://www.agromanual.cz/cz/atlas/vykladovy-slovník/fytoalexiny.html> [cit. 2011-03-20]
- [12] Využití HPLC při stanovení rostlinných metabolitů [online]. Dostupné z: <http://orion.sci.muni.cz/virtuallab/navody/HPLC.pdf> [cit. 2011-03-20]
- [13] ZLOCH, Z. Zdravotní efekt polyfenolů z hlediska jejich příjmu a využitelnosti. *Vojenské zdravotnické listy* [online]. 2003, roč. 72, č. 5 [cit. 2011-03-20], str. 226–229. Dostupné z [http://www.pmfhk.cz/VZL/VZL5\\_2003/Vz15\\_8.pdf](http://www.pmfhk.cz/VZL/VZL5_2003/Vz15_8.pdf)
- [14] Proč pít zelený čaj. [online]. Dostupné z <http://www.celostnimediceina.cz/proc-pit-zeleny-caj.htm> [cit. 2011-03-20]
- [15] MENDELOVÁ, L. *Antimutagenní aktivita obsahových látek v zelenině a v ovoci. Disertační práce*, Brno: MU, 2006
- [16] FERRAZZANO, G., F., AMATO, I., INGENITO, A., NATALE, A., POLLIO, A. Anti-cariogenic effects of polyphenols from plant stimulant beverages (cocoa, coffee, tea). *Fitoterapia* [online]. 2009, vol. 80 [cit. 2011-03-20], p. 255–262. Dostupné z [www.elsevier.com/locate/fitote](http://www.elsevier.com/locate/fitote)
- [17] Čaj. Wikipedia [online]. Dostupné z <http://cs.wikipedia.org/wiki/%C4%8Caj> [cit. 2011-03-20]
- [18] DAI, F., CHEN, W., ZHOU, B. Antioxidant synergism of green tea polyphenols with  $\alpha$ -tocopherol and L-ascorbic acid in SDS micelles. *Biochimie* [online] 2008, vol. 90 [cit. 2011-03-20], p. 1499 – 1505. Dostupné z [http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws\\_home/505803/description#description](http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/505803/description#description)
- [19] LAMBERT, J., D., LEE, M., LU, H., MENG, X., HONG, J., SERIL, D., STURGILL, M., YANG, CH. Epigallocatechin-3-Gallate Is Absorbed but Extensively Glucuronidated Following Oral Administration to Mice. *The Journal of Nutrition* [online]. 2003, vol. 12 [cit. 2011-03-20], p. 4172–4177. Dostupné z <http://jn.nutrition.org/content/133/12/4172.full?sid=370bd284-654f-4184-a262-0f6cc771823e>

- [20] KATIYAR, S., AFAQ, F., PEREZ, A., MUKHTAR, H. Green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate treatment of human skin inhibits ultraviolet radiation-induced oxidative stress. *Oxford Journals - Carcinogenesis* [online]. 2001, vol. 22, č. 2 [cit. 2011-03-20], p. 287 – 294. Dostupné z <http://carcin.oxfordjournals.org/content/22/2/287.full?sid=c429e5cc-a6ae-405c-a457-233f37fe9f54>
- [21] PETRIKOVÁ, V., PATOČKA, J. Káva očima toxikologa. *Vojenské zdravotnické listy* [online]. 2006, č. 3 – 4 [cit. 2011-03-20], str. 120 – 125. Dostupné z <http://www.pmfhk.cz/VZL/vzl06.htm>
- [22] VIGNOLI, J., BASSOLI, D., BENASSI, M. Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. *Food Chemistry* [online] 2011, vol. 124 [cit. 2011-03-20], p. 863 – 868. Dostupné z <http://ees.elsevier.com/foodchem/>
- [23] SUKOVÁ, I. Káva brzdí kariogenní bakterie [online]. Dostupné z: <http://agronavigator.cz/default.asp?ids=150&ch=13&typ=1&val=96109> [cit. 2011-03-20]
- [24] ČEPIČKA, J., KARABÍN, M. Polyfenolové látky piva – přirozené antioxidanty. *Chem. Listy* [online] 2002, roč. 96 [cit. 2011-03-20], str. 90 - 95. Dostupné z [http://www.chemicke-listy.cz/common/article-vol\\_96-issue\\_2-page\\_90.html](http://www.chemicke-listy.cz/common/article-vol_96-issue_2-page_90.html)
- [25] HOFTA, P., DOSTÁLEK, P., BASAŘOVÁ, G. Xanthohumol – chmelová pryskyřice nebo polyfenol? *Chem. Listy* [online] 2004, roč. 98 [cit. 2011-03-20], str. 825 – 830. Dostupné z [http://www.chemicke-listy.cz/common/article-vol\\_98-issue\\_9-page\\_825.html](http://www.chemicke-listy.cz/common/article-vol_98-issue_9-page_825.html)
- [26] MIKYŠKA, A., HAŠKOVÁ, D., HORÁK, T., JURKOVÁ, M. Vliv typu chmelové suroviny na antioxidační vlastnosti piva. *Kvasný průmysl* [online] 2010, roč. 56, č. 7–8, [cit. 2011-03-20], str. 294 – 302. Dostupné z <http://kvasnyprumysl.cz/cz/journal/2010/7-8/>
- [27] Chmelové polyfenoly [online]. Dostupné z: <http://www.cz hops.cz/index.php/cs/hop-polyphenols> [cit. 2011-03-20]

- [28] KROFTA, K. Obsah prenylovaných flavonoidů chmele v českých a zahraničních pivech. *Kvasný průmysl* [online]. 2010, roč. 56 [cit. 2011-03-20], str. 1/2–9. Dostupné z <http://kvasnyprumysl.org/cz/journal/2010/1/>
- [29] KOLOCHOVÁ, I., MELZOCH, K., ŠMIDRKAL, J., FILIP, J. Obsah resveratrolu v ovoci a zelenině. *Chem. Listy* [online] 2005, roč. 99 [cit. 2011-03-20], str. 492 – 495. Dostupné z [http://www.chemicke-listy.cz/common/article-vol\\_99-issue\\_7-page\\_492.html](http://www.chemicke-listy.cz/common/article-vol_99-issue_7-page_492.html)
- [30] DADÁKOVÁ, E., VRCHOTOVÁ, N., TŘÍSKA, J., KYSELÁKOVÁ, M. Stanovení volného a celkového kvercetinu v moravských červených vínech. *Chem. Listy* [online] 2003, roč. 97 [cit. 2011-03-20], str. 558 – 561. Dostupné z [http://www.chemicke-listy.cz/common/article-vol\\_97-issue\\_7-page\\_558.html](http://www.chemicke-listy.cz/common/article-vol_97-issue_7-page_558.html)
- [31] Vývoj funkčního sýru obsahujícího polyfenoly. *Potravinářský zpravodaj*, 2010, č. 8, str. 30. ISSN 1801 - 9110
- [32] Chromatografie [online]. Dostupné z: [http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy\\_B/chromatografie.doc](http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy_B/chromatografie.doc) [cit. 2011-03-20]
- [33] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2. vyd. Pavel Klouda, Ostrava 2003. ISBN 80-86369-07-2.
- [34] HPLC [online]. Dostupný z www: <http://hplc.cz/> [cit. 2011-03-20]
- [35] HPLC [online]. Dostupný z www: <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html> [cit. 2011-03-20]
- [36] BLAŽKOVÁ, A. *Stanovení kyseliny ginkgolové metodou HPLC. Diplomová práce*, Zlín: UTB, 2009
- [37] ŠTULÍK, K. a kol. *Analytické separační metody*. 1. vyd. Karolinum UK v Praze, Praha 2005. ISBN 80-246-0852-9
- [38] HERNYCHOVÁ, L. Základy hmotnostní spektrometrie [online]. Dostupné z: [http://pmfhk.cz/Prednasky/Hmotnostni\\_spektrometrie\\_08.pdf](http://pmfhk.cz/Prednasky/Hmotnostni_spektrometrie_08.pdf) [cit. 2011-03-20]

- [39] *Esquire/HCT series User Manual, Version 1.3*, Bremen (D): Bruker Daltonik GmbH 2008, p. 70
- [40] Hmotnostní analyzátory [online]. Dostupné z: [http://holcapek.upce.cz/teaching/MS04\\_Hmotnostni\\_analyzatory.pdf](http://holcapek.upce.cz/teaching/MS04_Hmotnostni_analyzatory.pdf) [cit. 2011-03-20]
- [41] MĚŘÍNSKÁ, R. *Studium fenolických látek ve vybraných biologických materiálech s využitím metody LC/MS. Bakalářská práce*, Brno: MU 2008
- [42] DE RIJKE, E. et al. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A* [online] 2006, [cit. 2011-03-20], p. 31 – 63. Dostupné z www: <[www.elsevier.com/locate/chroma](http://www.elsevier.com/locate/chroma)>

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization – chemická ionizace za atmosférického tlaku
API	Atmospheric Pressure Interface - rozhraní atmosférického tlaku
AU	Average unit – relativní průměrná jednotka
CI	Chemická ionizace
DMX	Desmethylxanthohumol
EC	Epikatechin
ECG	Epikatechin gallát
EGC	Epigallokatechin
EGCG	Epigallokatechin gallát
ESI	Elektrospray ionization – ionizace elektrosprejem
FAB	Fast atom bombardement – ionizace nárazem urychlenými atomy
FI	Field ionization - ionizace polem
GC	Gas chromatography – plynová chromatografie
HPLC	High performance liquid chromatography – vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IX	Isoxanthohumol
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization – ionizace laserem za účasti matrice
MS	Mass spectrometry – hmotnostní spektrometrie
RDA	Diels Alder reaction – Diels Alderova reakce
TOF	Time of flight – typ analyzátoru, ve kterém jsou ionty urychleny vysokým napětím do letové trubice bez el. pole
X	Xanthohumol



**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obr. 1: Základní jednoty a příslušné polymery .....	14
Obr. 2: Struktury molekul základních subkomponent .....	15
Obr. 3: Kyselina kávová .....	16
Obr. 4: Kyselina ferulová .....	16
Obr. 5: Flavanoly .....	17
Obr. 6: Flavanony .....	17
Obr. 7: Struktury molekul vybraných zástupců flavonoidů.....	18
Obr. 8: Struktury molekul kvercetinu a rutinu.....	19
Obr. 9: Katechin.....	19
Obr. 10: Proantokyanidin.....	20
Obr. 11: Hesperetin.....	21
Obr. 12: Genistein.....	21
Obr. 13: Resveratrol.....	22
Obr. 14: Čaj ( <i>Camellia sinensis</i> ).....	26
Obr. 15: Epigallocatechin (EGC) .....	27
Obr. 16: Epicatechin gallát (ECG) .....	26
Obr. 17: Epigallocatechin gallát (EGCG).....	27
Obr. 18: Arabská káva ( <i>Coffea arabica</i> ) .....	29
Obr. 19: Xanthohumol .....	32
Obr. 20: Réva vinná ( <i>Vitis vinifera</i> ) .....	34
Obr. 21: Schématický nákres kapalinového chromatografu .....	36
Obr. 22: Kolona. ....	38
Obr. 23: Fotometrický detektor. ....	39
Obr. 24: Refraktometrický detektor. ....	39
Obr. 25: Fluorescenční detektor.....	40
Obr. 26: Elektrochemický detektor.....	40
Obr. 27: Hrot jehly ve sprejové komoře. ....	46
Obr. 28: Desolvatace. ....	46

Obr. 29: Mechanismus odpařování iontů uvnitř komory ESI. ....	47
Obr. 30: Průřez iontou pastí. ....	49
Obr. 31: Černý čaj - Assasm Clasic Blend .....	54
Obr. 32: Zelený čaj - Ceylon Green Gowrakele .....	54
Obr. 33: Bílý čaj - Shou Mei.....	55
Obr. 34: Kalibrační křivka katechinu při vlnové délce 205 nm.....	62
Obr. 35: Kalibrační křivka theofylinu při vlnové délce 205 nm.....	63
Obr. 36: Kalibrační křivka rutinu při vlnové délce 205 nm.....	64
Obr. 37: Kalibrační křivka EGC při vlnové délce 205 nm. ....	65
Obr. 38: Kalibrační křivka kofeinu při vlnové délce 205 nm.....	66
Obr. 39: Kalibrační křivka kyseliny ferulové při vlnové délce 205 nm .....	67
Obr. 40: Kalibrační křivka kyseliny kumarové při vlnové délce 205 nm.....	68
Obr. 41: Kalibrační křivka kyseliny sinapové při vlnové délce 205 nm .....	69
Obr. 42: Kalibrační křivka kyseliny sinapové při vlnové délce 205 nm .....	70
Obr. 43: Hmotnostní spektrum rutinu v pozitivním módu .....	82
Obr. 44: Hmotnostní spektrum EC v pozitivním módu.....	82
Obr. 45: Hmotnostní spektrum EC v negativním módu .....	83
Obr. 46: Hmotnostní spektrum ECG v pozitivním módu.....	83
Obr. 47: Hmotnostní spektrum ECG v negativním módu .....	84
Obr. 48: Hmotnostní spektrum EGC v pozitivním módu.....	84
Obr. 49: Hmotnostní spektrum EGC v negativním módu .....	85
Obr. 50: Hmotnostní spektrum EGCG v pozitivním módu.....	85
Obr. 51: Hmotnostní spektrum EGCG v negativním módu .....	86
Obr. 52: Hmotnostní spektrum katechinu v pozitivním módu .....	86
Obr. 53: Hmotnostní spektrum theofylinu v negativním módu.....	87
Obr. 54: Hmotnostní spektrum resveratrolu v pozitivním módu.....	87
Obr. 55: Hmotnostní spektrum kyseliny sinapové v pozitivním módu .....	87
Obr. 56: Hmotnostní spektrum kofeinu v pozitivním módu.....	88
Obr. 57: Chromatogram zeleného čaje – kolona Dionex.....	89

---

Obr. 58: Chromatogram zeleného čaje – kolona Watrex.....	89
Obr. 59: Spektrum EC v zeleném čaji .....	90
Obr. 60: Spektrum EGCG v zeleném čaji.....	90
Obr. 61: Spektrum ECG v zeleném čaji .....	91
Obr. 62: Spektrum EGC v zeleném čaji .....	91
Obr. 63: Spektrum rutinu a theofylinu v zeleném čaji.....	92
Obr. 64: Spektrum resveratrolu v bílém čaji.....	92
Obr. 65: EC v bílém čaji .....	93
Obr. 66: Spektrum EGCG v bílém čaji.....	93
Obr. 67: Spektrum ECG v bílém čaji.....	94
Obr. 68: Spektrum EGC v bílém čaji.....	94
Obr. 69: Spektrum rutinu v černém čaji .....	95
Obr. 70: Spektrum katechinu a EGCG v černém čaji.....	95
Obr. 71: Spektrum EC v černém čaji.....	96
Obr. 72: Spektrum kofeinu v černém čaji.....	96

**SEZNAM TABULEK**

Tab. 1: Možné fenolické subkomponenty a příklady příslušných polyfenolů. ....	14
Tab. 2: Typy fenolických látek podle počtu uhlíků. ....	15
Tab. 3: Obsah flavonoidů v některých druzích ovoce a nápojů ( $\text{mg} \cdot 1000 \text{ g}^{-1}$ ). ....	24
Tab. 4: Obsah xanthohumolu, desmethylxanthohumolu v českých chmelech ....	31
Tab. 5: Obsah resveratrolu a kvercetin v zelenině ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{suš.}}$ ). ....	33
Tab. 6: Obsah resveratrolu a kvercetin v ovoci ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{suš.}}$ ) ....	33
Tab. 7: Obsah resveratrolu a kvercetin ve vzorcích burských oříšků ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{suš.}}$ ).....	34
Tab. 8: Gradientová eluce.....	56
Tab. 9: Parametry MS analýzy .....	58
Tab. 10: Retenční časy jednotlivých standardů [min] .....	61
Tab. 11. Kalibrace katechinu při vlnové délce 205 nm .....	62
Tab. 12. Kalibrace theofylinu při vlnové délce 205 nm .....	63
Tab. 13: Kalibrace rutinu při vlnové délce 205 nm .....	64
Tab. 14: Kalibrace EGC při vlnové délce 205 nm.....	65
Tab. 15: Kalibrace kofeinu při vlnové délce 205 nm .....	66
Tab. 16: Kalibrace kyseliny ferulové při vlnové délce 205 nm.....	67
Tab. 17: Kalibrace kyseliny kumarové při vlnové délce 205 nm .....	68
Tab. 18: Kalibrace kyseliny sinapové při vlnové délce 205 nm.....	69
Tab. 19: Kalibrace kyseliny gallové při vlnové délce 205 nm .....	70
Tab. 20: Retenční časy polyfenolických. látek v zeleném čaji [min] .....	71
Tab. 21: Obsah kyseliny gallové v zeleném čaji .....	71
Tab. 22: Obsah theofylinu v zeleném čaji .....	72
Tab. 23: Obsah katechinu v zeleném čaji .....	72
Tab. 24: Obsah kofeinu v zeleném čaji.....	73
Tab. 25: Obsah kyseliny kumarové v zeleném čaji .....	73
Tab. 26: Obsah kys. ferulové v zeleném čaji.....	73
Tab. 27: Obsah kys. sinapové v zeleném čaji .....	74
Tab. 28: Obsah rutinu v zeleném čaji .....	74

Tab. 29: Retenční časy polyfenolických látek v bílém čaji [min] .....	75
Tab. 30: Obsah kyseliny gallové v bílém čaji.....	75
Tab. 31: Obsah theofylinu v bílém čaji.....	75
Tab. 32: Obsah katechinu v bílém čaji .....	76
Tab. 33: Obsah kofeinu v bílém čaji.....	76
Tab. 34: Obsah kyseliny kumarové v bílém čaji .....	76
Tab. 35: Obsah kyseliny sinapové v bílém čaji .....	77
Tab. 36: Obsah rutinu v bílém čaji .....	77
Tab. 37: Retenční časy polyfenolických látek v černém čaji [min].....	78
Tab. 38: Obsah kyseliny gallové v černém čaji.....	78
Tab. 39: Obsah theofylinu v černém čaji.....	78
Tab. 40: Obsah katechinu v černém čaji.....	79
Tab. 41: Obsah kofeinu v černém čaji .....	79
Tab. 42: Obsah kyseliny kumarové v černém čaji.....	80
Tab. 43: Obsah kyseliny sinapové v černém čaji.....	80
Tab. 44: Obsah rutinu v černém čaji.....	80
Tab. 45: Obsah EGC v černém čaji .....	81
Tab. 46: Přehled standardů a jejich molekulových hmotností.....	81