

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

**Fakulta přírodovědecká
Katedra analytické chemie**

STANOVENÍ FENOLICKÝCH LÁTEK V POTRAVINÁCH

DIPLOMOVÁ PRÁCE

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra analytické chemie



**ANALÝZA FENOLICKÝCH LÁTEK
V POTRAVINÁCH**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce: Pavla Vybíralová

Studijní obor: Analytická chemie

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.

Termín odevzdání práce: 22. 4. 2016

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod odborným dohledem Doc. RNDr. Petra Bartáka, Ph.D.. Veškerou použitou literaturu jsem uvedla na konci práce.

Souhlasím s tím, aby práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

Vlastnoruční podpis

Chtěla bych zde poděkovat Doc. RNDr. Petru Bartákovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné připomínky a čas, který mi při vypracovávání diplomové práce poskytl.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Pavla Vybíralová

Název práce: ***Analýza fenolických látek v potravinách***

Typ práce: Diplomová

Pracoviště: Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2016

Abstrakt: Diplomová práce se v teoretické části zabývá dělením fenolických sloučenin, výskytem, vlastnostmi a pozitivními účinky na lidské zdraví spojovými s antioxidační aktivitou. Práce popisuje možnosti stanovení fenolických sloučenin. Experimentální část je zaměřena na stanovení resveratrolu, fenolických kyselin, vitamínu E, katechinu a quercetinu ve vzorcích rostlinných olejů. Pozornost je věnována metodě kapalinové extrakce (LLE) a alkalické hydrolýze s následným použitím extrakce tuhou fází (SPE). Zmiňované fenolické sloučeniny byly poté analyzovány pomocí plynové chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem.

Klíčová slova: polyfenoly, antioxidanty, resveratrol, vitamín E, GC-MS, derivatizace, LLE, SPE

Počet stran: 78

Jazyk: čeština

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Pavla Vybiralová

Title: *Analysis of phenolic compounds in food*

Type of thesis: Master

Department: Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science,
Palacký University in Olomouc, Czech Republic

Supervisor: Doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.

The year of presentation: 2016

Abstrakt: Teoretical part deals with the classification of phenolic compounds, occurrence and properties which have positive effects on human health. The thesis describe possibilities of determination of phenolic compounds. Experimental part is focused on determination of resveratrol, phenolic acids, vitamin E, catechin, quercetine in samples of vegetable oils. Attention is paid to liquid-liquid extraction (LLE) and alkaline hydrolysis associate with solid phase extraction (SPE). Phenolic compounds were analyzed with the aid of GC-MS.

Keywords: polyphenols, antioxidants, resveratrol, vitamin E, GC-MS,
derivatization, LLE, SPE

Number of pages: 78

Language: Czech

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	TEORETICKÁ ČÁST	2
2.1	Fenolické sloučeniny	2
2.1.1	Dělení fenolických sloučenin.....	3
2.1.1.1	Flavonoidy	3
2.1.1.2	Fenolové kyseliny	6
2.1.1.3	Stilbeny	8
2.1.1.4	Lignany	11
2.1.1.5	Další fenolické sloučeniny.....	12
2.1.2	Vitamin E	14
2.1.2.1	Výskyt a vlastnosti vitamínu	16
2.1.2.2	Příjem, transport a distribuce vitamínu	18
2.1.2.3	Funkce vitamínu	19
2.1.3	Výskyt fenolických sloučenin v potravinách	20
2.1.4	Chemické vlastnosti fenolických sloučenin	22
2.1.5	Metabolické dráhy fenolických sloučenin	23
2.1.6	Vliv fenolických sloučenin na lidské zdraví	25
2.1.7	Stanovení fenolických látek v potravinách.....	27
2.1.7.1	Úprava vzorku.....	27
2.1.7.1.1	Hydrolyza.....	28
2.1.7.1.2	Extrakční techniky	28
2.1.7.2	Metody stanovení fenolických látek	39
2.1.8	Derivatizace.....	44
2.1.8.1	Alkylace	45
2.1.8.2	Silylace	46
2.1.8.3	Acylace.....	47
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	48
3.1	Chemikálie, přístroje, pomůcky	48
3.2	Pracovní postup.....	48
3.2.1	Příprava, derivatizace a analýza vzorku	48
3.2.1.1	L-L extrakce	48
3.2.1.2	SPE.....	49

3.2.1.3	Derivatizace	49
3.2.1.4	Analýza vzorků	49
4	VÝSLEDKY A DISKUSE	51
4.1	L-L extrakce	51
4.2	SPE	59
5	ZÁVĚR	61
6	LITERATURA	62

1 ÚVOD

Již v roce 1940 byly zjištěny příznivé účinky resveratrolu v kořenech čemeřice bílé a křídlatky japonské, které se běžně používaly v tradiční čínské a japonské medicíně. Látka byla uznávána pro své ohromné účinky při léčbě kožního onemocnění, zánětů či aterosklerózy (1).

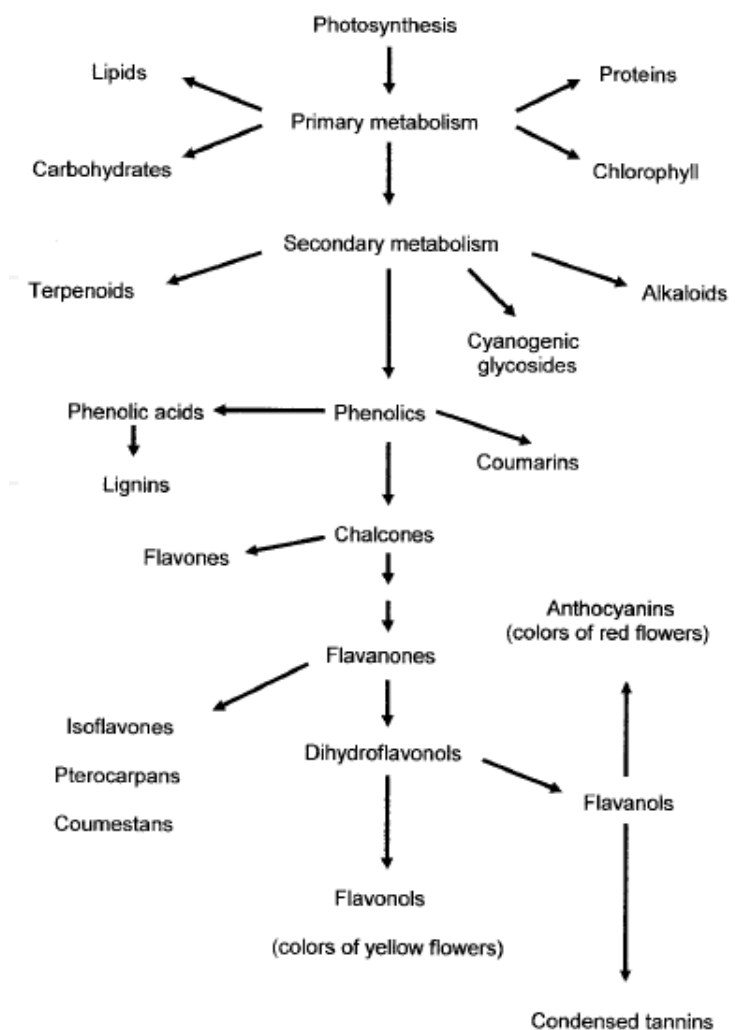
V dnešní době je kladen velký důraz na zdraví člověka, zdravý životní styl a pestré složení stravy. Z tohoto důvodu, neustále roste zájem o studium fenolických látek, jejichž příjem v potravinách je spojován se snižujícím se výskytem závažných chorob a onemocnění, mezi které patří nádorová či kardiovaskulární onemocnění. Statisticky bylo prokázáno, že v některých částech Francie byla nižší úmrtnost na srdeční choroby i přes nadměrné používání tuku. Tento paradox bylo možné vysvětlit tím, že jeden z faktorů ovlivnění je konzumace vína. To obsahuje fenolické látky (2).

Fenolické látky jsou skupinou různorodých látek, jež mají široké uplatnění (vonné látky, barviva, nositele chuti) a navíc jsou nedílnou součástí většiny potravin. Některé z těchto látek se řadí mezi přírodní antioxidanty díky svým biologickým účinkům, k rostlinným obranným látkám nebo toxickým látkám potravin (3). Tyto složky se nacházejí v různých částech rostlin (kořen, list, plod). Mezi nejběžnější fenolické rostlinné látky patří fenolové kyseliny, flavanoidy a lignany. Dnes je známo více jak 8000 fenolických struktur, z nichž více jak 4000 struktur jsou flavonoidního typu (4). Důležitými zdroji fenolických látek je ovoce, zelenina, nápoje a také čokoláda. Obsah fenolických látek je ovlivněn jak genetickými, tak vnějšími faktory při růstu potravin (5).

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Fenolické sloučeniny

Fenolické látky nebo také polyfenoly patří do skupiny přírodních látek, které jsou běžně přítomny v potravinách. Tyto látky vznikají jako sekundární metabolity rostlin. Je známo, že metabolismus rostlin je rozdělen na primární a sekundární. Metabolismus primární zahrnuje metabolické dráhy, které jsou potřebné k přežití rostliny. Spadá sem biosyntéza, přeměna bílkovin, nukleových kyselin, sacharidů a lipidů. Metabolismus sekundární je podmíněn metabolismem primárním, protože sekundární metabolity vznikají přeměnou metabolitů primárních, což je zobrazeno na obrázku 1. Sekundární metabolity slouží v rostlině jako obranné látky proti býložravcům či různým škůdcům (6) (7).



Obrázek 1: Vztah mezi primárním a sekundárním metabolismem rostlin (7).

Společným charakteristickým rysem fenolických sloučenin je přítomnost alespoň jednoho aromatického jádra, substituovaného hydroxylovou skupinou. Dalším společným znakem je vazba na jiné molekuly a to buď na sacharidy, nebo bílkoviny. Nicméně, je to méně časté, ale v rostlinách se mohou vyskytovat i volné sloučeniny (8).

2.1.1 Dělení fenolických sloučenin

Fenolické látky mohou být řazeny do různých tříd v závislosti na počtu aromatických kruhů a substituentů vázaných na tato jádra. Sloučeniny mohou být klasifikovány na základě počtu uhlíků ve struktuře (Tab. 1). Polyfenoly dále mohou být děleny podle charakteru látek, na flavonoidní (př. flavony, flavonoly, flavanoly) a neflavonoidní (př. fenolové kyseliny a jejich deriváty) (7) (9). Hlavními skupinami fenolických látek jsou flavonoidy, fenolové kyseliny, stilbeny a lignany (10).

Tabulka 1: Dělení látek na základě počtu uhlíků ve sloučenině (3) (7).

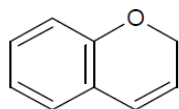
Skupiny látek	Základní skelet
Fenoly, Benzochinony	C_6
Kyseliny fenolové	$C_6 - C_1$
Kyseliny fenylacetové, Acetofenony,	$C_6 - C_2$
Kyseliny skořicové, Fenypropeny, Kumariny, Isokumariny, Chromony	$C_6 - C_3$
Naftochinony	$C_6 - C_4$
Xanthony	$C_6 - C_1 - C_6$
Stilbeny, Anthrachinony	$C_6 - C_2 - C_6$
Flavonoidy, Isoflavonoidy	$C_6 - C_3 - C_6$
Lignany, Neolignany	$(C_6 - C_3)_6$
Biflavonoidy	$(C_6 - C_3 - C_6)_2$
Ligniny	$(C_6 - C_3)_n$
Flavolany	$(C_6 - C_3 - C_6)_n$

2.1.1.1 Flavonoidy

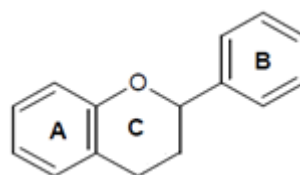
Doposud je známo více jak 8000 polyfenolických sloučenin, z toho více jak 4000 struktur patří mezi rostlinné flavonoidy, látky jsou zodpovědné za barevnost květů, plodů a listů. Z chemického hlediska se jedná o látky s obecnou strukturou $C_6 - C_3 - C_6$. Látky obsahují ve své struktuře dvě aromatická jádra spojená uhlíkatým řetězcem se 3 uhlíky. Tří uhlíkový řetězec tvoří uzavřený pyranový kruh (C) s jedním z benzenových jader (A),

což je ukázáno na obrázku 3. Flavonoidy jsou děleny do 6 podskupin v závislosti na oxidačním stavu pyranového kruhu.

Patří sem flavonoly, flavony, flavanony, isoflavony, anthokyanidiny a flavanoly (11). Flavonoidy jsou odvozeny od 2H-chromenu (Obr. 2), který je substituovaný fenylovou skupinou (B) v poloze C2, vzniklá sloučenina se nazývá flavan (Obr. 3) (12) (13).



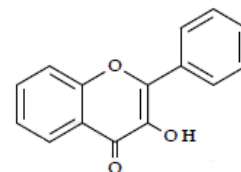
Obrázek 2: 2H-chromen.



Obrázek 3: Flavan.

Flavonoly

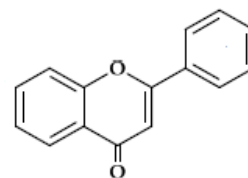
Z flavonoidů patří flavonoly k nejrozšířenějším látkám v rostlinách. Jsou to bezbarvé molekuly, které se hromadí v listech rostlin, jejich biosyntéza je stimulovaná především světlem. Zajímavostí je, že rozdíly v koncentraci látky mohou existovat v ovoci ze stejného stromu, to je důsledkem různé expozice slunečního světla (14). Mezi běžné flavonoly se základní strukturouobrazenou na obrázku 4 patří quercetin a miricetin.



Obrázek 4: Základní struktura flavonolu.

Flavony

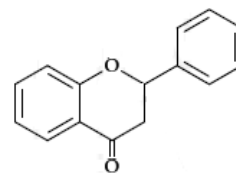
Flavony (Obr. 5) mají dvojnou vazbu mezi C2 a C3, jsou obecně méně zastoupeny než flavonoly. Mezi hlavní zástupce patří apigenin a luteolin.



Obrázek 5: Základní struktura flavonu.

Flavanony

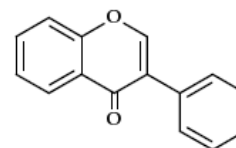
Flavanony jsou charakteristické svým nasyceným tříuhlíkovým řetězcem (Obr. 6). Obvykle jsou glykosilovány disacharidy na uhlíku C7. Látky jsou přítomny ve velkých koncentracích v citrusových plodech, kde způsobují hořkou chuť. Hlavní aglykony jsou naringenin v grapefruitech, hesperetin v pomerančích a eryodictyol v citróněch (10).



Obrázek 6: Základní struktura flavanonu.

Isoflavony

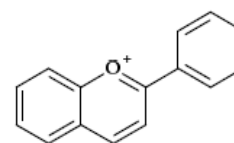
Většina flavonoidů má aromatický kruh B vázaný v poloze C2 (Obr. 3), zatímco isoflavony mají aromatický kruh navázaný v poloze C3 (Obr. 7). I když látky nejsou steroidy, mají podobnou strukturu. Jsou schopny vázat estrogény a jsou klasifikovány jako fytoestrogény. Hlavní molekuly isoflavonů jsou genistein, daidzein a glycitein. V potravě jsou tyto látky přítomny výhradně v luštěninách. Mohou být vázány jako aglykony, glykosidy, acetylglukosidy nebo malonylglukosidy. Isoflavony jsou citlivé na teplo a často hydrolyzují během zpracování a skladování (15).



Obrázek 7: Základní struktura isoflavonu.

Anthokyaniny

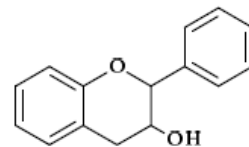
Anthokyaniny (Obr. 8) jsou ve vodě rozpustná barviva, zodpovědná za červené, modré a fialové zbarvení květů a plodů. Vyskytují se především jako glykosidy, respektive ve formě aglykonu nazývané anthokianidiny. Nejčastěji vázanými cukry v poloze C3 jsou glukóza, galaktóza, xylóza, arabinóza, fruktóza a v poloze C3 a C5 se váží disacharidy. Mezi významné anthokianidiny patří kyanidin, pelargonidin, peonidin, delphinin, petunidin a malvidin (16) (17).



Obrázek 8: Základní struktura anthokyanu.

Flavanoly

Flavanoly nebo flavan-3-oly obsahují nasycený tříuhlíkový řetězec s hydroxylovou skupinou v poloze C3 (Obr. 9). Látky existují buď jako monomerní nebo polymerní formy (proanthokianidiny a taniny). Na rozdíl od jiných tříd flavonoidů, flavanoly nejsou v potravinách glykosilované. Mezi zástupce patří katechiny, epikatechiny vyskytují se zejména v ovoci, zatímco galokatechiny, epigalokatechiny a epigallokatechin galláty se vyskytují v čaji (10).



Obrázek 9: základní struktura flavanolu.

2.1.1.2 Fenolové kyseliny

Fenolové kyseliny patří mezi jedny z hlavních tříd polyfenolických sloučenin, tyto látky jsou velmi rozšířené v potravinách rostlinného původu. Kyseliny se řadí mezi neflavonoidní polyfenolické sloučeniny a jsou děleny do dvou skupin. Deriváty kyseliny benzoové s uhlíkatou kostrou $C_6 - C_1$ a deriváty kyseliny skořicové s uhlíkatou kostrou $C_6 - C_3$, tyto deriváty se od sebe liší polohou svých hydroxylových a methoxylových skupin na aromatickém kruhu (18).

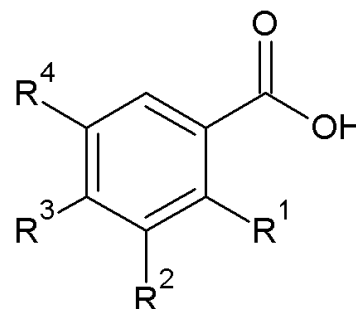
Fenolové kyseliny se často vyskytují v ovoci a zelenině ve formě volných fenolických kyselin, zatímco zrníčka a semena obsahují fenolické kyseliny vázané. Tyto kyseliny mohou být uvolněny bazickou, či alkalickou hydrolýzou (12). Mezi deriváty kyseliny benzoové patří kyselina salicylová, *p*-hydroxybenzoová, vanillová, syringová, protokatechová, gallová, gentisová a veratrová (Obr. 10) (19). Kyselina gallová a protokatechová se vyskytuje velmi málo v rostlinných produktech konzumovaných člověkem. A to je důvodem toho, že nejsou považovány za nutričně zajímavé látky. Obsah kyselin je obecně velmi nízký, avšak existují výjimky, kde se tyto látky mohou nacházet. Příkladem jsou ostružiny, které obsahují do 270 mg/kg. U derivátů kyseliny benzoové se předpokládají protinádorové a antioxidační účinky (10).

Mezi deriváty kyseliny skořicové se řadí *o*-kumarová, *m*-kumarová, *p*-kumarová, ferulová, sinapová a kávová kyselina (Obr. 11). Kyseliny se zřídka vyskytují ve volné formě, vázané kyseliny jsou často glykosilovány deriváty esterů kyseliny chinové, šikimové a vinné. Kyselina kávová s kyselinou chinovou tvoří chlorogenové kyseliny, které se hojně

vyskytují v ovoci a kávě. Dalšími příbuznými sloučeninami kyseliny chlorogenové jsou kyseliny neochlorogenové, kryptochlorogenové, isochlorogenové, 3-*p*-kumaroylchinové a 3-feruloylchinové. Kyselina kávová je jedna z nejrozšířenějších fenolických kyselin. Ester kyseliny kávové s kyselinou 2-hydroxy-3-(3,4-dihydroxyfenyl)-propionovou tvoří kyselinu rosmarinovou. Kyselina skořicová a její deriváty jsou přítomny v ovoci, nicméně největší koncentrace jsou přítomny ve vnějších částech zralého ovoce. Kyselina ferulová se obvykle vyskytuje v obilných produktech (př. rýže) (10) (20).

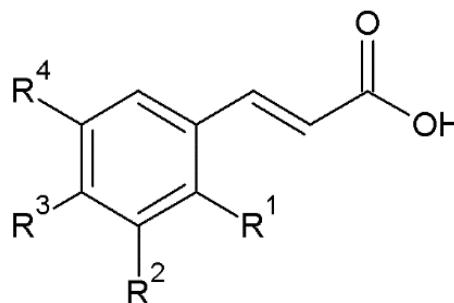
Deriváty kyseliny skořicové snižují srážlivost krve, poskytují inhibiční aktivitu proti enzymům – tripsinu, který způsobuje pankreatitidu. Vyznačují se svými protinádorovými účinky a jsou prevencí proti autoimunitním onemocněním (21). Fenolické kyseliny jsou považovány za velmi silné antioxidanty. Látky vykazují antibakteriální, protizánětlivé, antikarcinogenní a proliferační účinky (18).

Kyselina	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
Salicylová	OH	H	H	H
<i>p</i> -hydroxybenzoová	H	H	OH	H
vanillová	H	OCH ₃	OH	H
syringová	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
protokatechová	H	OH	OH	H
gallová	H	OH	OH	OH
gentisová	OH	H	OH	H
veratrová	H	OCH ₃	OCH ₃	H



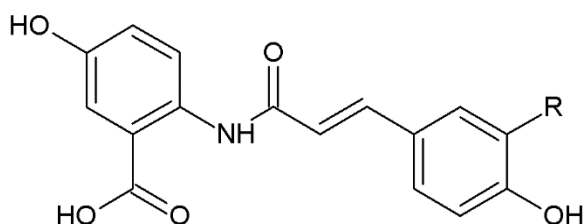
Obrázek 10: Strukturní vzorce derivátů kyseliny benzoové.

Kyselina	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
<i>o</i> -kumarová	OH	H	H	H
<i>m</i> -kumarová	H	OH	H	H
<i>p</i> -kumarová	H	H	OH	H
ferulová	H	OCH ₃	OH	H
sinapová	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
kávová	H	OH	OH	H

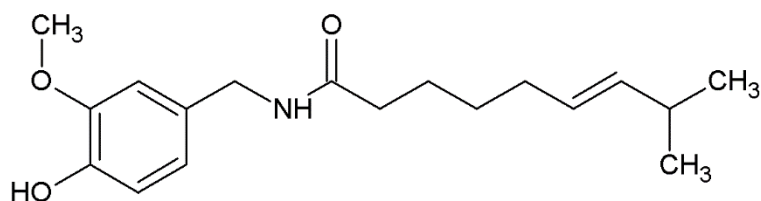


Obrázek 11: Strukturní vzorce derivátů kyseliny skořicové.

Mezi deriváty fenolových kyselin patří také estery (depsidy) s kyselinou jablečnou (*p*-kumaroyl-, kaffeoyl-), kyselinou vinnou (vanilloyl-), cholinestery fenolových kyselin tzv. sinapiny. Ty jsou charakteristické svojí hořkou a svíravou chutí. Dále sem řadíme amidy fenolových kyselin. Nejznámějšími skupinami polyfenolických amidů jsou avenanthramidy (Obr. 12). Látky vyskytující se v ovsu. Kapsaicinoidy - kapsaicin (Obr. 13) nacházející se v paprice jsou odpovědné za ostrost chilli papriček (12).



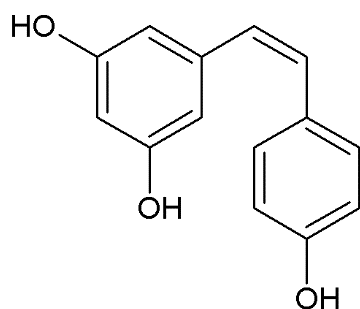
Obrázek 12: Struktura avenanthramidu (R = H, Avenanthramid A; R = OCH₃, Avenanthramid B; R = OH, Avenanthramid C).



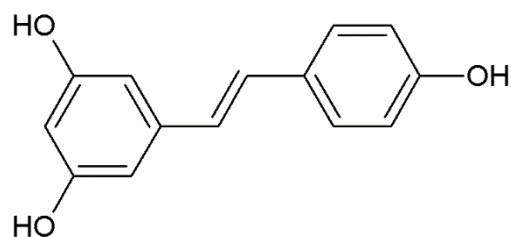
Obrázek 13: Struktura kapsaicinu.

2.1.1.3 Stilbeny

Základní strukturou stilbenů je 1,2-difenylethen, C₆–C₂–C₆. Stilbeny se svojí strukturou podobají flavonoidům. V lidské potravě jsou zastoupeny v malém množství. Bylo identifikováno více než 70 druhů rostlin, včetně hroznů, bobulí a arašídů, jež obsahují tyto sloučeniny (10).



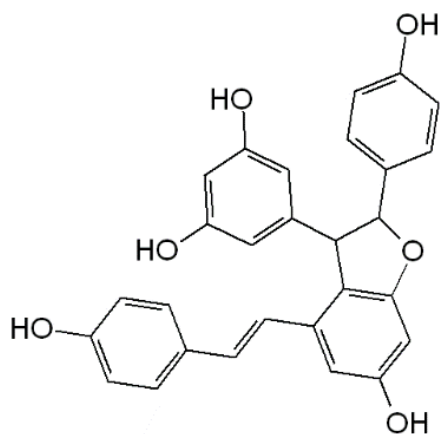
A



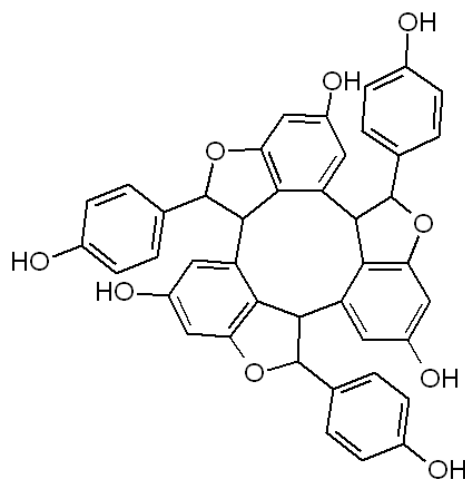
B

Obrázek 14: *Cis* (A) a *trans* (B) forma resveratrolu.

Nejznámější a nejhojněji zastoupenou sloučeninou této skupiny je resveratrol, ve své struktuře obsahuje 3 hydroxylové skupiny, nazývá se 3,4',5-trihydroxystilben (Obr. 14). Stilbeny se mohou vyskytovat volné nebo vázané ve formě glykosidu. V rostlinách se vyskytuje glukosid resveratrolu, piceid, kde β -glukosylová skupina je vázána v poloze 3. Možné navázání skupiny je i v poloze 4' za vzniku resveratrolosidu. V rostlinách se vyskytují i oligomery resveratrolu, např. dimer ϵ -viniferin a trimer α -viniferin (Obr. 15).



A



B

Obrázek 15: Struktura dimeru ϵ -viniferinu (A) a trimeru α -viniferinu (B)

Rostliny produkují tyto látky jako sekundární metabolity, které je chrání vůči škodlivým patogenům, nebo při vystavování rostlin stresovým podmínkám (poškození rostliny). Jeden z obranných mechanismů buňky je tvorba fytoalexinů, ty se začínají tvořit v místě poškození, kde také dochází k jejich akumulaci. Největší koncentrace resveratrolu v rostlině je po 24 -96 hodinách od poškození či vystavení rostliny stresovým podmínkám, poté dochází k poklesu stilbenu až na původní koncentraci. Stilbeny jsou v rostlinách přítomny ve dvou izomerních formách, *cis* a *trans*. Izomerní formy jsou odlišné svými biologickými účinky. V rostlinách je přítomna směs těchto izomerů, ale obvykle převažuje *trans* forma. UV zářením dochází k izomeraci *trans* formy na *cis* formu (3) (5) (9).

Zvláště bohatým zdrojem resveratrolu jsou slupky červených hroznů (1). U červených a bílých vín jsou velké rozdíly v koncentracích resveratrolu, to je dáno odrůdami hroznů. Červená vína obsahují 2 – 6 mg·l⁻¹, zatímco vína bílá obsahují 0,2 – 0,8 mg·l⁻¹. Mezi běžně konzumované potraviny s vysokým obsahem resveratrolu řadíme například čekanku, brokolici, červené zelí, cibuli, papriku (Tab. 2) (5) (22).

Tabulka 2: Obsah resveratrolu v potravinách.

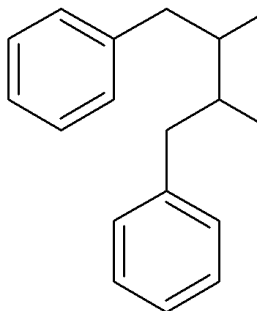
Rostlina	Obsah resveratrolu [mg·kg ⁻¹]	Množství potraviny [kg] obsahující 1 mg resveratrolu
Červené zelí	2,4	0,4
Brokolice	1,8	0,6
Čekanka	1,0	1,0
Červená řepa	1,8	0,6
Cibule žlutá	1,5	0,7
Podzemnice olejná	1,9	0,5

Resveratrol je látkou špatně rozpustnou ve vodě. Velmi dobrým rozpouštědlem resveratrolu je alkohol, tedy i alkohol ve víně. Stilbeny se také podílí na vlastnostech vína, dodávají jim určitou barvu a hořkost.

Stilbeny jsou spojovány s pozitivními účinky na lidské zdraví. Snižují riziko kardiovaskulárních, karcinogenních onemocnění, mají za následek pokles hladiny LDL-cholesterolu a jsou prevencí proti ateroskleróze (15) (23) (24).

2.1.1.4 Lignany

Lignany tvoří skupinu neflavonoidních látek, které se strukturně vyznačují spojením dvou fenylpropanových jednotek, vazbou v β -pozici na propanovém řetězci (obrázek 16).

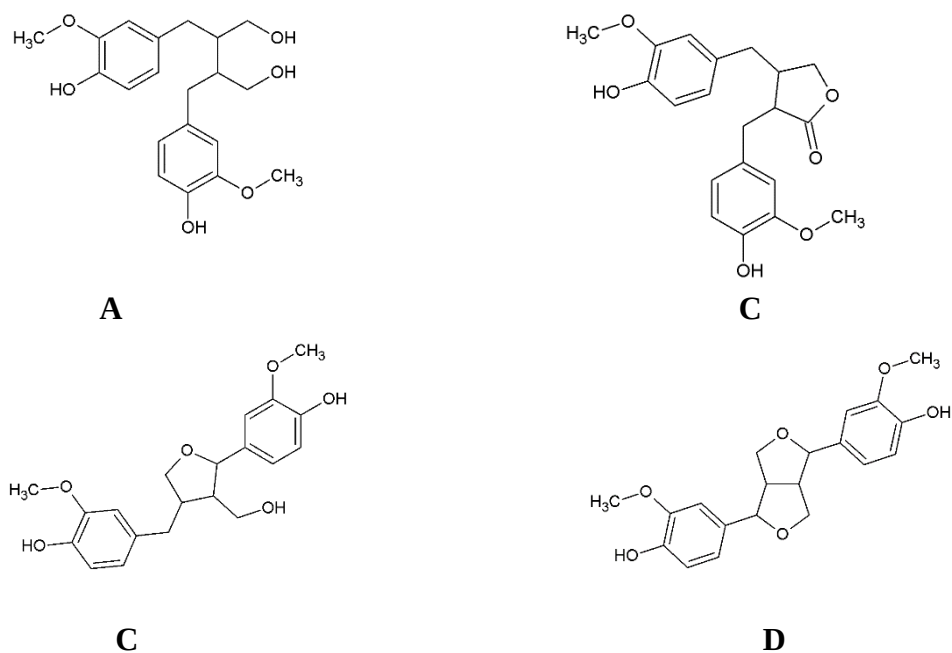


Obrázek 16: Základní struktura lignanu.

Lignany jsou produkovány oxidační dimerizací dvou fenylpropanových jednotek. Jsou-li fenylpropanové jednotky spojené dalším uhlíkem, řadí se do třídy neolignanů. Lignany zahrnují mnoho sloučenin s podobnou základní strukturou, ale jinou substitucí (13). Látky jsou často přítomny ve volné formě, zatímco glykosidové deriváty se vyskytují již v menší míře.

Význam lignanů pro lidské zdraví je především kvůli metabolismu střevní mikroflóry, která se stará o deglykosylaci. Tato metabolizace vede ke vzniku molekul aktivitou podobných estrogenů. Lignany můžeme řadit mezi fytoestrogeny. Tyto aktivní metabolity jsou nazývány jako savčí lignany, tedy aglykony enterodiol a enterolakton, formovány z secoisolariciresinolu a lariciresinolu. Studie prováděné na zvířatech, která dostávala stravu bohatou na lignany, ukázaly svoji přítomnost molekul v nízkých koncentracích v séru (11). To naznačuje, že látky mohou být absorbovány střevy. Tyto molekuly vykazují účinky, jak *in vivo*, tak *in vitro*, inhibují angiogenezi, redukují cukrovku a potlačují růst nádoru.

Nejbohatším zdrojem lignanů je lněné semínko, které obsahuje především secoisolariciresinol, ale také lariciresinol, pinoresinol a matairesinol (Obr. 17). Lněné semínko obsahuje až 3,7 g secoisolariciresinolu v kilogramu. Dalším důležitým zdrojem lignanů je celá řada semínek (př. sezamová), také černý čaj, káva, ovoce a zelenina. Avšak koncentrace u zmíněných potravin je 100-1000 krát nižší než u lněného semínka (25).

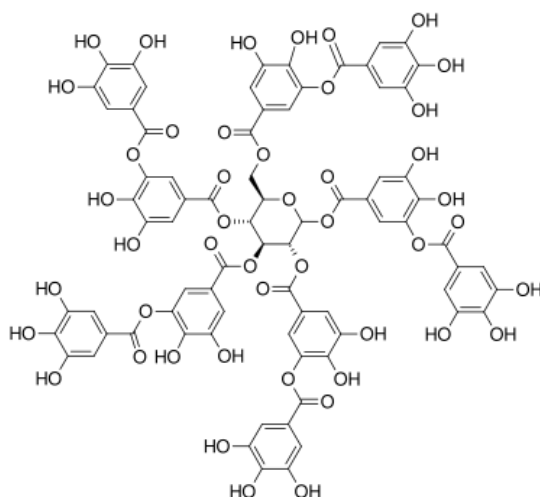


Obrázek 17: Struktury secoisolariciresinolu (A), lariciresinolu (B), pinoresinolu (C), matairesinol (D).

2.1.1.5 Další fenolické sloučeniny

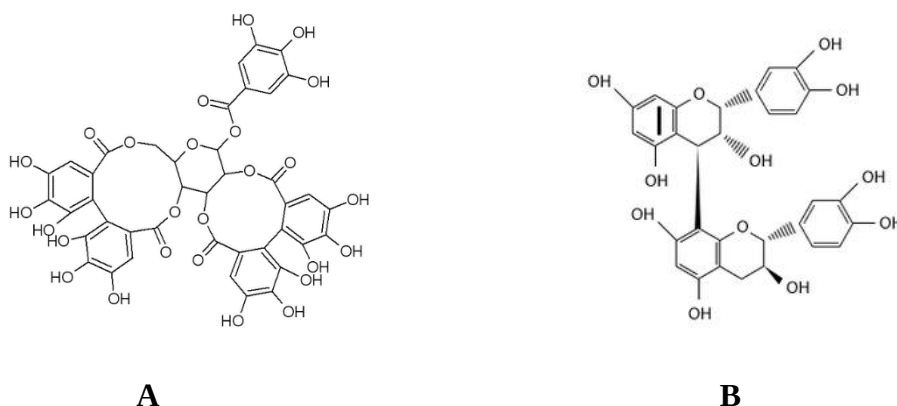
Taniny

Taniny jsou fenolické sloučeniny se střední až vysokou molekulovou hmotností (500-3000D) a mohou být rozděleny do dvou skupin: hydrolyzovatelné a nehydrolyzovatelné (kondenzované taniny). K dispozici je i třetí skupina látek – phlorotaniny, vyskytující se v hnědých mořských řasách. Ty ovšem nejsou běžně konzumované člověkem. Hydrolyzovatelné taniny mají centrum tvořené glukosou či vícesytným alkoholem, jsou částečně nebo úplně esterifikovány kyselinou gallovou a tvoří gallotaniny či ellagitanniny. Vzniklé metabolity jsou snadno hydrolyzovány kyselinami, bazemi nebo enzymy. Nicméně mohou také oxidativně kondenzovat a tvořit polymery s vysokou molekulovou hmotností. Nejznámější hydrolyzovatelný tanin je kyselina tříslová (Obr. 18), což je gallotanin sestávající se z molekuly pentagalloyl glukosy, které mohou být dále esterifikovány pěti molekulami kyseliny gallové (7).



Obrázek 18: Struktura kyseliny tříslové.

Kondenzované taniny jsou polymery katechinu a/nebo leukoanthokyanidinu. Patří mezi nehydrolyzovatelné látky (Obr. 19). Představují hlavní fenolické frakce zodpovědné za trpkost potravin. Termín kondenzované taniny je neustále používán, ale chemicky správnější termín je proanthokyanidin. Látky jsou polymerní flavonoidy a tvoří anthokyanidinové pigmenty. Mezi studované látky patří proanthokyanidin, založený na flavan-3-ol-epikatechinu a katechinu. Antioxidační aktivita byla podstatně nižší než aktivita flavonoidů, avšak nedávné výzkumy ukázaly, že antioxidační aktivita souvisí se stupněm polymerace (7) (26).



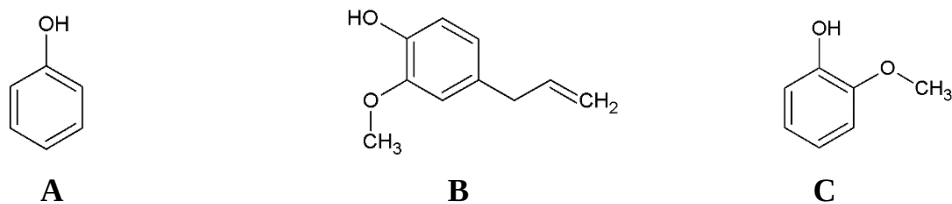
Obrázek 19: Chemické struktury hydrolyzovatelného taninu – casuarictin (**A**) a kondenzovaného taninu – proanthocyanidinu (**B**).

Ligniny

Ligniny jsou látky, které způsobují zdřevnatění stěn buněk a působí, jako zpevňující materiál. Zmiňované fenoly se v potravinách používají jako vonné látky, mohou vznikat při zpracování potravin. Tyto sekundární látky vznikají působením mikroorganismů na lignin nebo fenolové kyseliny. Pyrolýzou ligninu vzniká guajakol a ten je známý tím, že se do uzených potravin dostává jako složka kouře. Tyto složky stabilizují barvu, slouží jako konzervační prostředek a dodávají výrobkům aroma. Dále se lignin uplatňuje při výrobě whisky, kdy dochází k vyluhování ligninu z dubových sudů alkoholem, ethanolem (3).

Jednoduché fenoly

Jednoduché fenoly jsou látky odvozené od fenolu a vyskytují se jako složky silic. Nejznámějšími sloučeninami jsou látky karvakrol a thymol, jež se nachází v tymiánové silici. Látka eugenol je hlavní složkou v hřebíčkové silici. Isoeugenol je obsažen v silici bazalky a řada dalších vonných silic je odvozena od 2-methoxyfenolu (guajakolu) (Obr. 20) (3).



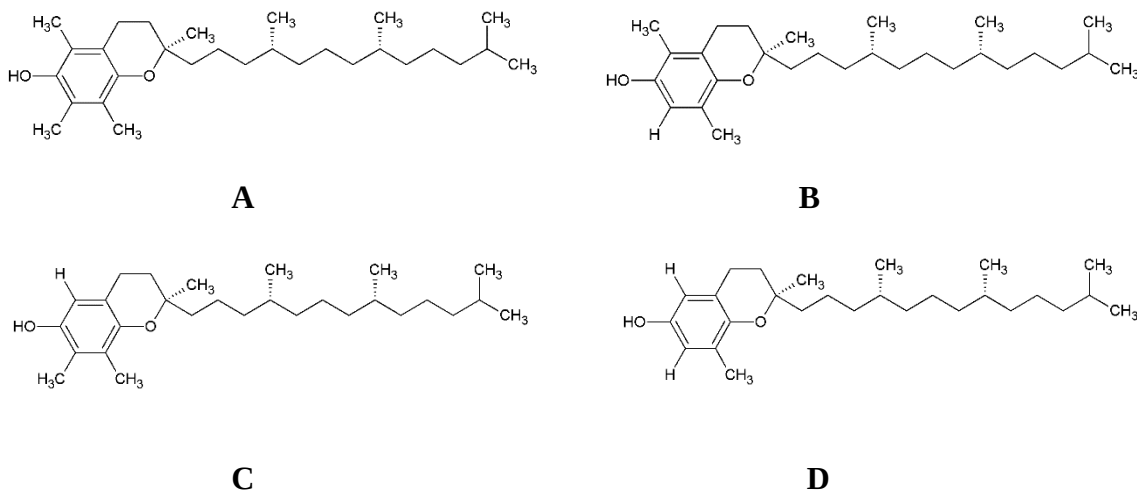
Obrázek 20: Struktura fenolu (A), eugenolu (B) a guajakolu (C).

2.1.2 Vitamín E

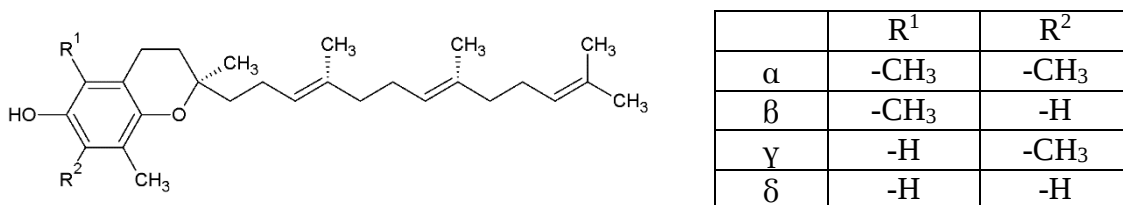
Vitamín E je souhrnné pojmenování přírodních sloučenin, tokoferolů, tokotrienolů a formálně patří mezi fenolické látky. Je to světle žlutá olejovitá látka, rozpustná v tucích, nerozpustná ve vodě. Přírodní vitamín E se skládá z osmi různých forem α , β , γ , δ – tokoferolu (Obr. 21) a α , β , γ , δ – tokotrienolu (Obr. 22).

Sloučeniny na obrázcích 21 a 22 obsahují chromanový kruh s různou polohou methylové a hydroxylové skupiny, která poskytuje vodíkový atom ke snížení volných radikálů. Postranní řetězec umožňuje pronikání do biologických membrán. Tokotrienoly mají nenasycené isoprenoidní postranní řetězce s jedním chirálním centrem na 2C chromanového

kruhu, zatímco tokoferoly obsahují trimethyltridecylový zbytek se třemi chirálními centry (2C chromanového kruhu, 4 a 8 C v řetězci). Nejrozšířenějším a nejaktivnějším tokoferolem je RRR – α – Tokoferol (27) (28).

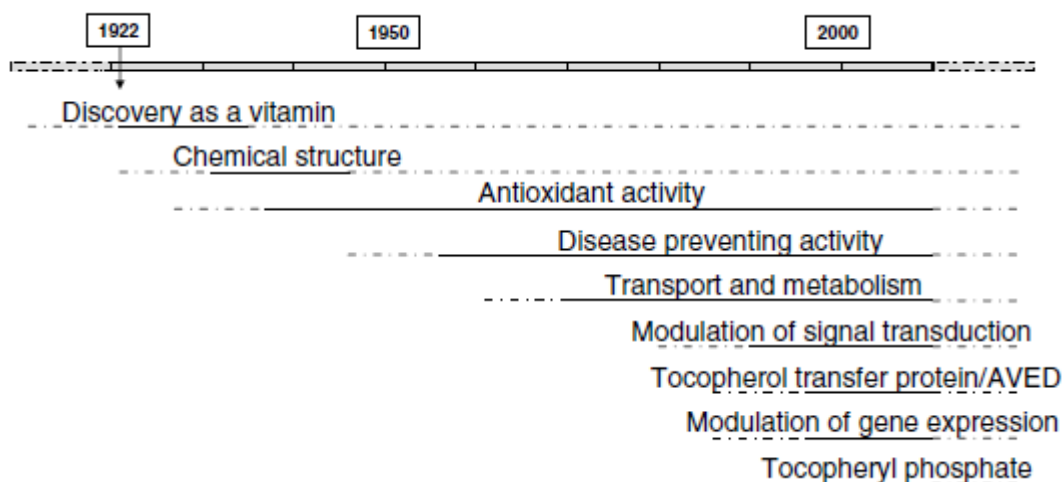


Obrázek 21: Struktura α – tokoferolu (**A**), β – tokoferolu (**B**), γ – tokoferolu (**C**), δ – tokoferolu (**D**).



Obrázek 22: Obecná struktura tokotrienolu.

Vitamin E byl objeven v roce 1922 při pokusech na krysách. Když krysy dostávaly krmivo postrádající vitamin E (α -tokoferol), staly se neplodné. Poté jim bylo podáváno krmivo obsahující vitamin E (olej z obilných klíčků) a krysy se staly opět plodnými. V roce 1924 dostal vitamin svůj název a vyznačoval se tím, že podporoval plodnost. Tokoferol pochází z řeckého názvu, tokos = porod, phero = nést a ol = zakončení indikující alkoholové vlastnosti. Obrázek 23 ukazuje klíčové objevy na vitamínu E, které určují hlavní směry výzkumu. Hlavní objevy na vitamínu E byly prováděny již před více jak devadesáti lety Evansem a Bishopem (29).



Obrázek 23: Hlavní objevy vitamínu E (29).

2.1.2.1 Výskyt a vlastnosti vitamínu

Různé formy tokoferolu se nachází jak v rostlinných, tak živočišných potravinách. Obecně platí, že živočišné zdroje jsou omezené (máslo, vaječný žloutek, játra). Tokoferoly jsou výhradně syntetizovány fotosyntetickými organismy, zejména vyššími rostlinami. Významné množství látek se nachází v zelených tkáních, avšak převážná část se vyskytuje v semenech (zejména γ – tokoferol). Největším zdrojem vitamínu E je zelenina, semínka, oleje.

Olejové složky zrníček, semínek a ořechů obsahují tokoferol. Ochranná slupka, či zárodek je část nejbohatší na vitamín E, jenž se snadno může ztratit mletím mouky nebo zjemňováním zrn. Pokud má být vitamín E zachován, musí docházet k extrakci oleje z ořechů a semen přírodní cestou, tzn. lisováním za studena. Obsah vitamínu E ve většině potravin souvisí s obsahem kyseliny linolové a linoleové, jedněch z nejvíce rozšířených mastných kyselin. Obsah α –tokoferolu se u různých potravin a olejů liší. Jeden z nejlepších zdrojů α –tokoferolu je světlicový, olivový a slunečnicový olej. Kukuřičný olej obsahuje zejména γ –tokoferol, olej získaný ze sójových bobů obsahuje především δ –tokoferol. Tyto tokoferoly jsou také součástí palmového oleje, významné množství nalezneme i v rýžových a ovesných otrubách viz tabulka 3.

Tabulka 3: Obsah jednotlivých tokoferolů a tokotrienolů v cereáliích a olejích (mg·kg⁻¹), převzato z (3).

Vitamin	Pšenice	Žito	Ječmen	Oves	Kukuřice	Rýže	Proso	Olej klíčků pšenice	Řepkový olej
α-tokoferol	9,7-14,0	8,0-16,0	3,7-11,6	4,3-8,9	0,2-22,1	0,6-7,5	0,8	1328	300
β-tokoferol	3,9-7,0	2,2-4,0	0,2-0,7	0,6-0,9	0,4	0,7	0,5	505	-
γ-tokoferol	-	6,0	0,2-12,9	0,9	17,5-56	0,8-4,0	23,3	112	481
δ-tokoferol	-	-	0,1-0,9	-	0,3-3,8	0,2-0,5	6,1	51	29
α-tokotrienol	2,4-5,0	12,5-15	13-36	11-25,2	0,3-2,6	1,0-4,1	<0,2	40	<10
β-tokotrienol	19-33	7,0-11,8	2,7-14,3	0,9-3,3	-	<0,2	-	140	-
γ-tokotrienol	-	<0,2	3,6-8,4	0,2	3,3-9,9	2,0-9,5	0,7	-	-
δ-tokotrienol	-	-	0,7-3,9	0,2	-	0,2-0,7	-	-	-
celkem	35-39	32-44	31-80	19-38	22-94	4-27	31,6	2180	820

V rostlinách bylo popsáno několik důležitých funkcí vitamínu E. A to prevence neenzymatické oxidace lipidů v průběhu klíčení a růstu rostliny, schopnosti vitamínu bránit se fotooxidačnímu stresu a přizpůsobení rostliny nižší teplotě. Mezi potraviny obsahující větší množství vitamínu E patří sójové boby, rostlinné oleje, hrášek, špenát, chřest a okurka a další potraviny zmíněné v tabulce 4 (30).

Tabulka 4: Příklad potravin obsahujících vitamín E (3).

Potravina	mg·kg ⁻¹
maso	2,5 - 7,7
játra	4,0 - 14,0
mléko	0,2 - 1,2
máslo	10,0 - 50,0
sýry	3,0 - 3,5
vejce	5,0 - 30,0
ryby	4,0 - 80,0
rýže	0,4 - 4,5
sójové boby	2,7 - 13,0
jablko	1,8 - 7,4
špenát	16,0 - 25,0
vlašské ořechy	35,4

Již dříve bylo objeveno, že vitamín E brání oxidaci lipidů. Probíhaly i biochemické studie antioxidační aktivity vitamínu E. Dnes je známo, že α-tokoferol patří mezi nejrozšířenější formy vitamínu E. α-tokoferol je z látek považován za nejúčinnější, zatímco β-tokoferol

je prokazatelný 50% aktivitou α -tokoferolu, γ -tokoferol okolo 10% a δ -tokoferol asi 3% aktivitou α -tokoferolu (3). Avšak velkou pozornost přitahuje také γ -tokoferol, kdy bylo zjištěno, že jeho antioxidační aktivita u rakoviny tlustého střeva je větší než u α -tokoferolu (31). Následující tabulka poskytuje data biologické a antioxidační aktivity různých forem tokoferolů. Z tabulky 5 je patrné, že α -tokoferol má nejvyšší biologickou aktivitu a nižší antioxidační aktivitu, zatímco γ -tokoferol a δ -tokoferol mají vyšší antioxidační aktivitu (32).

Tabulka 5: Biologická a antioxidační aktivita různých forem tokoferolů (32).

Kind of Tocopherol	Biological Activity (IU/mg)	Antioxidant Activity (d-Alpha-Toc = 100)
dl-Alpha-Tocopherol acet.	1	0
d-Alpha-Tocopherol acet.	1.36	0
dl-Alpha-Tocopherol	1.1	100
d-Alpha-Tocopherol	1.49	100
d-Beta-Tocopherol	0.75	130
d-Gamma-Tocopherol	0.15	200
d-Delta-Tocopherol	0.05	300-500

1IU je definována jako 1 mg syntetického D,L- α -tokoferol-acetátu. Tokoferoly jsou stabilní v kyselém prostředí, zatímco v alkalickém prostředí nad 40°C se rozkládají. Sloučeniny ve formě esterů jsou stabilnější vůči oxidaci. Avšak stabilita vůči oxidaci klesá s rostoucím počtem methylových skupin ve sloučenině. Vitamín E ztrácí svoji aktivitu vzdušným kyslíkem, působením UV záření a průmyslovým zpracováním olejů (29) (33) (34).

2.1.2.2 Příjem, transport a distribuce vitamínu

Průměrná koncentrace α -tokoferolu v plazmě je okolo 23,2 μM , hodnota pod 11,6 μM je považována jako deficitní. Koncentrace α -tokoferolu je 10-100 krát vyšší než koncentrace γ -tokoferolu (2,5 μM) a δ -tokoferolu (0,3 μM). Nejvyšší obsah α -tokoferolu se nachází v tukových tkáních (150 $\mu\text{M/g}$ tkáně) a nadledvinkách (132 $\mu\text{M/g}$ tkáně). Orgány jako játra, srdce, ledviny obsahují 7-40 μM α -tokoferolu na gram tkáně. Rozdílná množství tokoferolů v tkáních naznačují tkáňové specifické mechanismy pro transport tokoferolů. Příjem a distribuce tokotrienolů v lidském těle není příliš efektivní, koncentrace v plazmě bývá pod 1 μM . Nicméně studie ukázaly, že dostatečné množství tokotrienolů se může přijmout

formou vitamínových doplňků a utvářet tak neuroprotektivní funkce mozku. Bylo popsáno několik proteinů, které mohou vázat tokoferoly. Tokoferoly vázané na protein zvyšují svůj transport do mitochondrií až 10 krát. Mezi lidské proteiny vážící α – tokoferol patří α – TTP a albuminu blízký protein afamin, přítomný v mozkomíšní tekutině. Kromě vitamínu E, proteiny váží i jiné přírodní látky (skvalen) s relativně vysokou afinitou (29).

Nadbytek α –tokoferolu, ostatních tokoferolů a analogy tokotrienolů jsou metabolizovány před exkrecí. To naznačuje, že organismus udržuje správnou hladinu vitamínu E selektivní retencí určitého množství α –tokoferolu a specifickým metabolismem dalších tokoferolů a tokotrienolů. Vitamín E je z potravy vstřebáván pomocí enterocytů, buněk sliznice střeva. Nasycené mastné kyseliny triacylglyceridů se středně dlouhými řetězci podporují vstřebávání tohoto vitamínu. Mezi hlavní metabolity α -tokoferolu patří kyselina tokoferová a gamalaktoglukuronid. Některé metabolity tokoferolů mohou působit jako bioaktivní sloučeniny a jsou schopné zachycovat reaktivní formy kyslíku a dusíku. Mohou se na ně navázat a měnit tak jejich aktivitu (29) (35).

2.1.2.3 Funkce vitamínu

Primární funkce vitamínu E je antioxidace, což je v současné době velmi důležité. Vitamín E snižuje oxidaci lipidových membrán a nenasycených mastných kyselin, navíc zabráňuje odbourávání živin kyslíkem. Ochranné, nutriční a antioxidační vlastnosti jsou tvořeny a podporovány dalšími vitamíny, příkladem je vitamín C a betakaroten. Oxidace tukových molekul v lidském těle, zejména polynenasycených a oxidovatelných tuků způsobuje vznik volných radikálů. Vzniklé nestabilní molekuly mohou způsobit buněčné a tkáňové poškození, což vede až k chronickým zánětům. Volné radikály vznikají z chemických reakcí odehrávající se v lidském těle a jsou základem mnoha nemocí. Vitamín E může chránit tkáň před oxidací a volnými radikály. Bez vitamínu E jsou buněčné membrány, aktivní enzymová místa a DNA méně chráněny před poškozením volnými radikály. Přispívá ke stabilizaci buněčné membrány, chrání tkáň kůže, očí, jater, prsu a varlat, jež jsou náchylnější na oxidaci. Chrání také plíce před oxidativním poškozením látek z životního prostředí. Vitamín E pomáhá udržovat aktivitu vitamínu A, který je také rozpustný v tucích (36).

Klíčovou rolí vitamínu E je modifikace a stabilizace hladiny tuků v krvi, dále má protisrážlivé účinky a chrání membrány červených krvinek před oxidačním poškozením.

Vzhledem k tomu, že pomáhá zlepšovat odolnost a vytrvalost snižuje i rizika kardiovaskulárních onemocnění. I když vitamín E byl z prvopočátku považován za vitamín podporující plodnost, nejsou známy žádné důkazy o tom, že by to tak bylo. Tento fakt může být zapříčiněn antioxidačními účinky vitamínu, zlepšením krevního oběhu a okysličováním. Vitamín E je nápomocný při prevenci aterosklerózy, kdy jeho antioxidační účinky snižují tvorbu trombinu a snižují vznik krevních sraženin. Vitamín A a E pomáhají snížit hladinu cholesterolu. Vitamín E se používá při léčbě kožních onemocněních, vředů, popálenin nebo na suchou pokožku. Vitamín se využívá k posílení imunity při virových onemocněních, při prevenci očních (zelený zákal), ledvinových, jaterních, svalových, nádorových či neuromuskulárních onemocněních (29) (37).

Doporučená denní dávka vitamínu E je v rozmezí 8 až 10 mg na den pro dospělého člověka. Vitamín není příliš toxický, protože nadměrný příjem je vylučován močí, stolicí. Také způsobuje snížení počtu červených krvinek a není doporučován osobám s vysokým krevním tlakem. Nedostatečné množství vitamínu je spojováno s poruchami vstřebávání tuku, s neurologickými potížemi a se sníženou obranyschopností organismu (36).

2.1.3 Výskyt fenolických sloučenin v potravinách

Fenolické sloučeniny jsou velmi rozšířené v rostlinných potravinách a jejich denní příjem by se měl pohybovat okolo 1 g (2). Kakao, brambory, rajčata, kapusta, brokolice, listová zelenina, luštěniny a obiloviny patří mezi potraviny bohaté na fenolické látky. Vysoká koncentrace fenolických látek, zejména anthokyaninů, je také obsažena v červeném víně, borůvkách a jahodách. Rostlinnými zdroji flavonů je řebříček, heřmánek, artyčok a tymián. Flavanoly jsou obsaženy v černém bezu, citrusové plody obsahují flavanony a isoflavonoidy se vyskytují v sóji. Bohatými zdroji fenolických látek je čaj, jak zelený, tak i černý, jež obsahuje zejména flavanoly. Káva je další významnou potravinou obsahující především kyselinu chlorogenovou, rozmarýn a meduňka obsahují kyselinu rosmarýnovou. Bobule (brusinky, maliny, borůvky a další) mají vysoký obsah fenolických kyselin. Lignany se vyskytují ve lněném semínku a žitě. Tabulka 6 ukazuje celkový obsah fenolických sloučenin v běžně známých potravinách (13) (18).

Tabulka 6: Celkový obsah fenolických látek v potravinách (7).

Zdroj	Obsah fenolických látek [mg/100 g vzorku]
Obiloviny a luštěniny	
Sójové boby	4,14
Oves	3,52
Pšeničná mouka	1,84
Zelenina	
Mrkev	0,68
Brokolice	0,88
Růžičková kapusta	0,69
Zelí bílé	0,76
Zelí červené	1,86
Čekanka	0,92
Kapusta	1,36
Salát	1,07
Rajče	1,50
Pórek	0,85
Špenát	1,12
Cibule, bílá	2,69
Cibule, žlutá	1,64
Cibule, červená	4,28
Bylinky a koření	
Bazalka	44,25
Chilli, zelené	1,07
Chilli, červené	2,77
Koriandr	3,74
Česnek	1,45
Zázvor	2,21
Máta	4,00
Pepř, černý	16,00
Pepř, bílý	8,00
Šalotka	17,18
Tymián	16,46
Ovoce	
Jablko, zelené	1,18
Jablko, červené	1,25
Borůvky	3,62
Višně, kyselé	1,56
Višně, sladké	0,79
Hrozny, červené	2,13
Hrozny, bílé	1,84
Grep	8,93
Kiwi	7,91
Citron	8,43
Limeta	7,51

Litchi	0,60
Nektarinka	0,38
Pomeranč	13,43
Broskev	0,53
Hruška	1,25
Ananas	0,94
Švestka	0,88
Pomelo	0,57
Granátové jablko	1,47
Maliny, červené	3,42
Jahody	1,99
Ostružiny	6,70
Další potraviny	
Pražené kakaové boby	13,05
Kakaová hmota	9,94
Čokoláda na pečení	3,49
Červené víno	2,42
Čaj, černý	0,62
Čaj, zelený	0,83
Káva	1,88

2.1.4 Chemické vlastnosti fenolických sloučenin

Fenolické látky mohou tvořit stabilní radikály. To je způsobeno interakcí π elektronů benzenového jádra a hydroxylovou skupinou. Díky tomu se antioxidanty objevují v různých oxidačních procesech (3). Chemická aktivita polyfenolů z hlediska jejich redukčních vlastností, (donory vodíku), předpovídá jejich potenciál lapačů volných radikálů. Antioxidační aktivita je určena reaktivitou vodíku ze sloučeniny, strukturou výsledného antioxidačního radikálu, delokalizací nepárového elektronu a reaktivitou s jinými antioxidanty. Polyfenoly mají ideální chemickou strukturu k zachycení volných radikálů (38). Výzkumy ukázaly, že reakce zprostředkovávající oxidaci a vznik volných radikálů jsou důsledkem procesů souvisejícími se stárnutím a onemocněním (rakovina, neurodegenerativní poruchy, onemocnění srdce). Antioxidační obrana organismu vůči reaktivním kyslíkovým částicím (atomární kyslíky, superoxidy, hydroxylové radikály) vzniká při buněčném dýchání a může být endogenní (enzymatická, neenzymatická) nebo potravinového původu (vitamíny, flavonoidy). Působením radikálů dochází k oxidačnímu stresu buňky, kdy celulární a extracelulární makromolekuly mohou trpět oxidačním poškozením. Tím dochází k poškození tkáně, ovlivnění imunitní funkce

buňky a vzniku výše zmíněných onemocnění. Zvýšený příjem antioxidantů napomáhá k udržování rovnováhy mezi antioxidanty a oxidanty v organismech. Bylo prokázáno, že polyfenolické sloučeniny jsou zodpovědné za tyto protektivní účinky (39) (40).

2.1.5 Metabolické dráhy fenolických sloučenin

Biologická dostupnost látek je podíl živin vstřebatelných, stravitelných a metabolizovaných přirozenými drahami. Biologická dostupnost jednotlivých polyfenolů se liší. Obecně platí, že aglykony mohou být sorbovány tenkým stěvem, avšak většina polyfenolů je v rostlinách přítomna ve formě esterů, glykosidů a polymerů, které nemohou být sorbovány v této původní formě. Tudíž před sorpcí musí docházet k hydrolýze sloučenin střevními enzymy nebo střevní mikroflórou. V průběhu sorpce polyfenolů dochází k jejich modifikaci, konjugaci se střevními buňkami a poté v játrech k methylaci, sulfataci a glukuronidaci. Formy vzniklých látek putující do krve a ke tkáním. Vzniklé formy látek jsou odlišné od těch, které se vyskytují v potravinách a tím je velmi obtížné určit jednotlivé metabolity a jejich biologickou aktivitu (2) (41) (42).

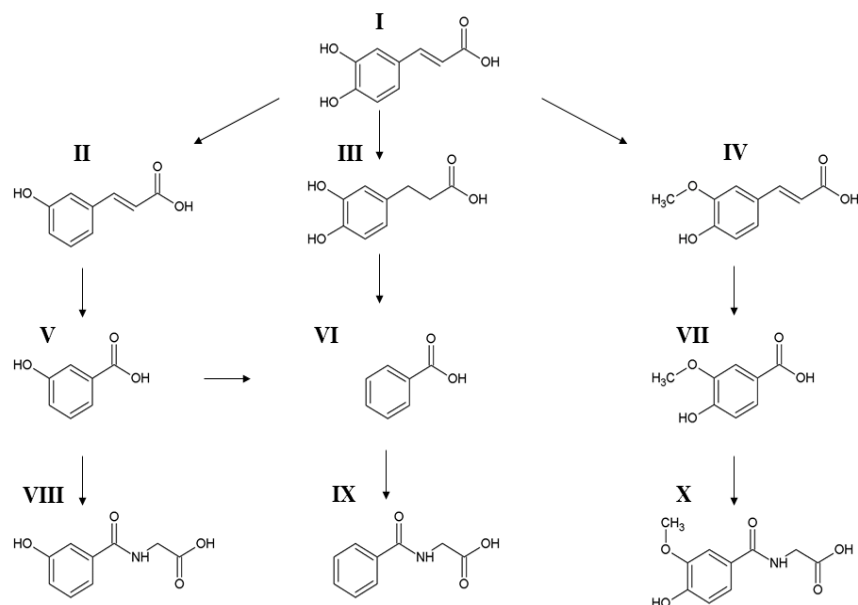
Polyfenoly se liší nejen svojí biologickou dostupností a aktivitou, ale také i místem sorpce. Některé látky jsou dobře absorbovatelné v gastro-intestinálním traktu. Příkladem látek existujících v potravinách v glykosilované formě jsou flavonoidy. Většina glykosidů je rezistentní vůči kyselé hydrolýze v žaludku. Tak se neporušené látky dostávají do střeva, kde působí enzym laktáza, ten přeměňuje glykosidy a určitá část vzniklých aglykonů může být sorbována. Glukosidy mohou být transportovány do enterocytů glukosovým přenašečem závislým na sodných iontech a poté hydrolyzovány cytosolickou β -glukosidásou (13) (43).

Proanthokyanidiny se liší od většiny rostlinných polyfenolů tím, že tvoří polymerní struktury s velkou molekulovou hmotností. Tyto znaky limitují jejich absorpci přes střevní bariéru a oligomery větší než trimery mají nepravděpodobnost absorpce v tenkém střevě.

Při požití kyseliny hydroxyskořicové ve volné formě dochází ke vstřebávání tenkým stěvem a ke konjugaci na flavonoidy. Avšak tyto sloučeniny jsou v přirozené formě v rostlinách esterifikované a to limituje jejich absorpci, protože střevní sliznice, játra a plazma nemají esterázy schopné hydrolýzy. K hydrolýze dochází mikroflórou tlustého střeva. Mikroflóra hydrolyzuje glykosidy na aglykony a tyto aglykony jsou metabolizovány na různé aromatické kyseliny. Aglykony jsou rozděleny otevřením heterocyklu v určitém bodu,

v závislosti na chemické struktuře látky a tím mohou produkovat různé kyseliny, které jsou dále metabolizovány na deriváty kyseliny benzoové (11) (44) (45).

Metabolity polyfenolů cirkulující v lidské krvi se váží na proteiny, zejména na albumin (primární protein zodpovědný za vazbu a transport). Albumin sehrává tedy důležitou roli v biologické dostupnosti polyfenolů a afinita polyfenolů k albuminu závisí na jejich struktuře. Akumulace polyfenolů v tkáních je důležitou fází metabolismu látek, protože zde dochází ke koncentraci a působení polyfenolů. Vylučování polyfenolů i s deriváty nastává močí a žlučí. Rozsáhlé konjugované metabolity jsou pravděpodobně vylučované žlučí, zatímco malé konjugáty jako monosulfáty jsou vylučovány močí. Zdraví prospěšné účinky polyfenolů jsou závislé na příjmu a jejich biologické dostupnosti. Na obrázku 24 je nakresleno a popsáno zjednodušené schéma metabolické přeměny kyseliny kávové (46) (47) (48).

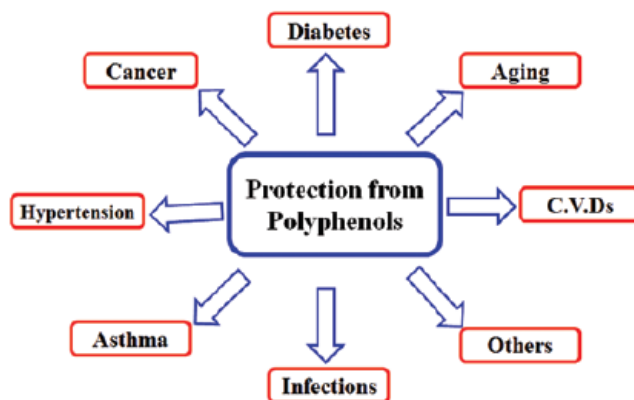


Obrázek 24: Ukázka zjednodušeného schématu metabolické přeměny kyseliny kávové.

Fenolové kyseliny podléhají dehydrogenačním reakcím, z kyseliny kávové (I) vzniká kyselina kumarová (II). Dále u kyseliny kávové v místě dvojné vazby dochází k hydrogenaci a přeměně na 3,4-dihydroxyfenylpropionovou kyselinu (III). Odbouráváním hydroxylových skupin vzniká kyselina 2-hydroxybenzoová (V) a kyselina benzoová (VI), vzniklé kyseliny konjugují s glycinem za vzniku hydroxybenzoylglycinu (VIII) a benzoylglycinu (IX). Kyselina kávová se může metabolizovat na kyselinu ferulovou (IV) a ta přechází na kyselinu vanillovou (VII). Reakcí kyseliny vanillové s glycinem vzniká vaniloylglycin (X) (46).

2.1.6 Vliv fenolických sloučenin na lidské zdraví

Výzkumy opakovaně prokázaly spojitost mezi prevencí chronických onemocnění a konzumací potravin bohatých na fenolické látky. Polyfenoly mohou přijímat elektron za vzniku stabilní formy radikálu a narušovat tak oxidační reakce probíhající v buňce. Potraviny bohaté na zmiňované látky mohou navyšovat antioxidační kapacitu v plasmě přítomností redukujících fenolů a jejich metabolitů (49) (50). Spotřeba antioxidantů byla spojena se snižujícím se poškozením DNA. Polyfenoly chrání buňky před oxidačním poškozením a tím se i snižuje riziko spojené s degenerativním poškozením, jež je spojované s oxidačním stresem buňky (Obr. 25) (51) (52).



Obrázek 25: Ochranné účinky polyfenolických látek vůči níže zmíněným onemocněním (11).

Řada studií prokázala, že konzumace polyfenolických látek snižuje riziko onemocnění srdce. Ateroskleróza je chronické, zánětlivé onemocnění srdce, které vzniká v lézích středních tepen. Polyfenoly jsou silnými inhibitory LDL (nízkoenzymní protein zodpovědný za ukládání cholesterolu) a tento typ oxidace úzce souvisí s vývojem aterosklerózy. Látky mají protektivní účinky vůči kardiovaskulárním onemocněním, jsou protizánětlivé a zvyšují HDL (vysokoenzymní lipoprotein uvolňující cholesterol do jater) (53) (54). Velmi rozšířeným polyfenolem vyskytujícím se v cibuli je Quercetin. Ukázalo se, že je spojen s prevencí vůči koronárnímu onemocnění srdce tím, že inhibuje expresi metaloproteinázy (11).

U katechinů v čaji byla prokázána inhibice proliferace buněk hladkého svalstva v arteriální stěně, tento mechanismus může přispět ke zpomalení tvorby aterosklerózy. Polyfenoly v čaji mají souvislost se snižováním vysokého krevního tlaku, což je pravděpodobně způsobeno jejich antioxidační aktivitou. Dále zdraví prospěšné látky mohou mít

antitrombotické účinky tím, že inhibují agregaci krevních destiček (55). Resveratrol je aktivní látkou vyskytující se ve víně, má průkaznou souvislost s kardiovaskulárním onemocněním. Je spojován s tzv. francouzským paradoxem, kde navzdory vysokému příjmu tuků a kouření, zde byl prokázán nižší výskyt onemocnění srdce. Resveratrol inhibuje oxidaci částic LDL reakcí s volnými radikály. Konzumace látek s vysokým obsahem polyfenolických látek byla spojena s nižším rizikem vzniku infarktu (1).

Protektivní účinek polyfenolických látek na linii nádorových buněk se nejčastěji projevuje snižováním počtu těchto buněk. Účinky látek byly pozorovány jak v ústech, žaludku, střevech, játrech či kůži. U quercetinu, katechinu, isoflavonů, lignanů, flavanonů, resveratrolu byly testováním prokázány protektivní účinky. Propuknutí rakoviny je vícestupňový proces, který lze rozdělit do tří fází: iniciace, propagace a progresse. Iniciací je dědičná aberace buňky, kde dochází k transformaci buňky a zhoubnému bujení (11). Bylo identifikováno několik mechanismů preventivního působení polyfenolických látek. Řadí se sem zastavení buněčného cyklu nebo buněčná smrt, prevence oxidace, protizánětlivá aktivita a změny v buněčné signalizaci. Polyfenolické látky ovlivňují metabolismus prokarcinogenů a mohou v lidském těle tvořit toxické chinony. Bylo prokázáno, že flaviny v černém čaji mají silné protinádorové účinky, inhibují proliferaci a zvyšují apoptózu buněk karcinomu prostaty (56). Resveratrol je typem látky s protektivními účinky vůči nádorovým onemocněním. Účinnost byla prokázána u většiny typů rakoviny (plic, kůže, prsu, prostaty, žaludku a tlustého střeva). Protinádorové účinky souvisí s jeho antioxidační aktivitou, inhibuje cyklooxygenasu, hydroperoxidasu a proteinkinázu, enzymy zodpovědné za vznik zánětů (57).

Poškozením metabolismu glukosy dochází k fyziologické nerovnováze, hyperglykémii a následně ke vzniku onemocnění diabetes mellitus. Diabetes můžeme rozdělit na dva typy, I. typu a II. typu. Dlouhodobé účinky cukrovky postihují oční orgán, což může vést až k slepotě, dále jsou zde rizika spojená s amputací končetin či vzniku vředů (11). Studie uvádějí antidiabetické účinky polyfenolických látek, př. katechiny v čaji, kde mohou ovlivňovat glykémii prostřednictvím různých mechanismů zahrnujících absorpci glukózy ve střevech. Jednotlivé polyfenoly, jako katechiny, epikatechiny, isoflavony, taniny inhibují střevní glykosidázy a přenašeče glukosy (58) (59). Quercetin obsažený v cibuli má také antidiabetické účinky. Studie ukázaly, že quercetin má protektivní účinek během oxidačního stresu působícího na buňku (60). Kyselina ferulová je velmi rozšířenou látkou vyskytující

se v zelenině a otrubách. Bylo potvrzeno, že kyselina působí silnými antidiabetickými účinky, snižuje hladinu glukózy v krvi a zvyšuje plazmový inzulin (61).

Stárnutí je procesem akumulace škodlivých změn v buňkách a tkáních s přibývajícím věkem, což vede ke zvýšení rizik onemocnění. Část určitého oxidativního poškození vzniká za normálních podmínek, avšak míra tohoto poškození se zvyšuje během procesu stárnutí. Bylo zjištěno, že příjem látek bohatých na fenolické sloučeniny snižuje škodlivé účinky stárnutí. Antokyany vyskytující se v ovoci, hroznech a hroznových zrníčkách jsou zodpovědné za silné antioxidační a protizánětlivé účinky. Inhibují peroxidaci lipidů a mediátory cyklooxygenázy (11) (62).

Polyfenolické látky jsou také zdraví prospěšné při zmírňování stárnutí nervového systému či mozku. Oxidační stres a poškození mozku je proces vyskytující se u neurodegenerativních onemocnění. Jedním z nejvíce se vyskytujícím onemocněním je Alzheimerova choroba. Konzumací polyfenolů vyskytujících se v přírodních potravinách můžeme poskytovat ochranu při neurologických nemocích. Bylo zjištěno, že lidé pijící tři až čtyři sklenky vína denně mají nižší procento vzniku onemocnění oproti lidem, kteří pijí méně nebo vůbec (63). Hojně rozšířenou látkou ve víně je resveratrol, ten vychytává kyslíkové a hydroxylové radikály, a s tím je spojena jeho antioxidační aktivita. Dále konzumace ovocných a zeleninových šťáv oddalují a chrání před vznikem onemocnění (64).

Jiné, zdraví prospěšné účinky fenolů byly prokázány při léčbě astmatu či ochraně před slunečním zářením (11).

2.1.7 Stanovení fenolických látek v potravinách

Důležitými kroky pro stanovení fenolických sloučenin je příprava vzorku, extrakce, následuje separace jednotlivých sloučenin a jejich kvantifikace pomocí instrumentálních metod.

2.1.7.1 Úprava vzorku

Rostlinné potraviny a nápoje jsou hlavními zdroji fenolických látek v lidské potravě, tudíž úprava vzorku hraje klíčovou roli při analýze fenolických sloučenin. Příprava a extrakce fenolických sloučenin z široké škály potravin závisí především na povaze těchto sloučenin,

chemických vlastnostech, molekulární struktuře, polaritě, koncentraci, počtu aromatických kruhů a hydroxylových skupin. Různorodost fenolických látek ve vzorku se vztahuje ke koncentraci jak jednoduchých, tak komplexních polyfenolických sloučenin i různým poměrům fenolických kyselin, flavonoidů a anthokyanidů. V těchto případech je obtížné volit pouze jeden způsob přípravy a extrakce pro takové množství produktů. Některé rostlinné vzorky je třeba vysušit lyofilizací, vzduchem či v peci. Vysušené, pevné vzorky se rozemelou a homogenizují, abychom získali částice o určité velikosti a tím i lepší výtěžky, zatímco kapalné vzorky jsou zpracovávány filtrací nebo centrifugací. Následně jsou pevné i kapalné vzorky extrahovány (19).

2.1.7.1.1 Hydrolýza

Kyselá a alkalická hydrolýza jsou nejběžnějšími způsoby k získání fenolických kyselin ze vzorku i za předpokladu, že může docházet k rozkladu kyselin. Působením anorganické kyseliny, př. HCl ve vodném nebo alkoholovém rozpouštědle dochází ke kyselé hydrolýze, reakční doba se pohybuje v rozmezí 30-60 minut. Vodný roztok kyseliny chlorovodíkové se vyznačuje tím, že rozkládá hydroxyskořicové kyseliny a jednotlivé ztráty se liší podle typu fenolové kyseliny, v rozmezí 15-95%, pro *o*-kumarovou a sinapovou kyselinu. Alkalická hydrolýza nebo také saponifikace zahrnuje zpracování vzorku s hydroxidem, př. NaOH o koncentraci 1 – 4 M. K reakci dochází za laboratorní teploty či zvýšené teploty a reakční doba se v literatuře liší svým trváním. Některé reakce je třeba provádět ve tmě, anebo pod inertní atmosférou (19) (65).

2.1.7.1.2 Extrakční techniky

Během extrakce dochází k ustalování rovnovážného stavu. Jak extrakce bude účinná, je dáno rozpustností látek v jednotlivých rozpouštědlech. Obecně se uplatňuje Liebigovo pravidlo, kdy platí, že při extrakci nepochárných látek se používají nepolární rozpouštědla a při extrakci látek polárních se používají rozpouštědla polární (66).

Extrakce v Soxhletově extraktoru

Metoda popsána v roce 1879 Soxhletem, byla běžně aplikována k extrakci lipidů z potravin. Metoda se řadí k nejstarším extrakčním technikám, stala se součástí normovaných

postupů a používá se také jako standard k extrakčním technikám, jež se vyvíjí. Při Soxhletově extrakci je pevný vzorek navážen do patrony a umístěn do aparatury. Rozpouštědlo kondenzuje do patrony, v níž je vzorek a tím dochází k vymývání rozpustných komponent ze vzorku. Rozpouštědlo, obohaceno o rozpuštěný analyt ze vzorku, se vrací do varné baňky, kde se proces několikrát opakuje, dokud není vyextrahováno dostatečné množství látky. Extrakce probíhá čistým rozpouštědlem a vyizolované látky by měly být stabilní při teplotě, kdy dochází k varu rozpouštědla. Velkou výhodou Soxhletovy extrakce je nízká pořizovací cena extraktoru, avšak jsou zde i nevýhody. Hlavní nevýhodou je časová náročnost, vysoké provozní náklady, jež jsou spojeny s velkou spotřebou rozpouštědla, které musí mít dostatečnou čistotu k následné prekoncentraci vzorku (67).

Extrakce nadkritickými tekutinami

Extrakce nadkritickými tekutinami (SFE – Supercritical Fluid Extraction) patří mezi moderní a používané techniky k izolaci látek z pevných vzorků. Velký rozvoj metody má úzkou souvislost s dekoфеinací kávy. Při extrakci se využívají vlastnosti látek v jejich nadkritickém stavu. Tento pojem je spojován s látkami vyskytujícími se při vyšší teplotě a tlaku, než je kritická hodnota. Nadkritická tekutina je přechod mezi kapalinou a plynem, kde kritický bod je definován T_k (kritická teplota) a p_k (kritický tlak). Nad kritickým bodem se látka nachází v nadkritickém stavu, což je stav, kde jsou spojeny vlastnosti jak plynů, tak kapalin. Z vlastností plynů se jedná o vyšší difuzní koeficienty, nízkou viskozitu, zatímco kapaliny mají dobré rozpouštěcí vlastnosti a velkou hustotu (66) (68).

V SFE se běžně k extrakci používá oxid uhličitý. Výhodou oxidu uhličitého je jednoduché dosažení kritických hodnot, dobrá dostupnost v přijatelných cenách, čistotě, dále je nehořlavý a netoxický. Nevýhodou je nízká polarita, která nedostačuje pro extrakci polárních látek. Oxid uhličitý je nepolární a je vhodný pro nepolární či málo polární látky. Pokud je ve vzorku polární látka, klesá její rozpustnost v nadkritickém oxidu uhličitém a to lze řešit přidávkou modifikátoru (polárnější látka). Často používanými modifikátory jsou například methanol, ethanol, chloroform, aceton, voda. Oxid uhličitý v nadkritickém stavu proniká vzorkem, kde extrahuje analyty a odvádí je do prostoru zachytu a zakoncentrování analytů pro následnou kvantitativní analýzu. Mezi výhody SFE patří nízká spotřeba rozpouštědel, mohou

se extrahovat sloučeniny, které nejsou teplotně stabilní. Metoda je časově nenáročná, avšak velkou roli zde hrají pořizovací náklady přístroje (19) (66) (69).

Mikrovlnně asistovaná extrakce

Mikrovlnně asistovaná extrakce (MAE) je metodou, při které se využívá mikrovlnné záření a to tak, že záření proniká do vzorku a společně s polárními molekulami rozpouštědla dochází k rovnoměrnému ohřevu vzorku. Tím se zvyšují migrační rychlosti molekul, rozpouštědlo lépe proniká do matrice vzorku a snadněji uvolňuje analyt. Metoda se používá k efektivnějším extrakcím, kde se vzorek během extrakce promíchává a ohřívá. Výhodou metody je její jednoduchost provedení, časová nenáročnost a možnost extrahovat více vzorků. Nevýhodou mikrovlnně asistované extrakce je, že se nemůže aplikovat u látek, které nejsou teplotně stabilní. Při mikrovlnné extrakci se používají polární rozpouštědla, protože rozpouštědla nepolární nejsou schopna absorbovat mikrovlnné záření. Během mikrovlnné extrakce se snižují extrakční časy a snižuje se i potřeba organického rozpouštědla (70) (71).

Ultrazvuková extrakce

Ultrazvuková extrakce je moderní a atraktivní metodou díky své vysoké účinnosti a kratším extrakčním časům oproti klasickým extrakčním technikám. Principem metody je využití zvukových vln při frekvencích 20 kHz. Vlivem ultrazvukových vln se rozpadá pevný materiál, a tím je umožněno snadnější pronikání molekul rozpouštědla do vzorku za uvolnění cílových složek. Pevný vzorek je ponořen do rozpouštědla a určitou dobu je vystaven ultrazvukovým vlnám, následně je zfiltrován nebo centrifugován a odpařením rozpouštědla zakonzentrován. Výhodou metody je její časová nenáročnost, jednoduchost, cena, efektivnost a rychlost převodu cílového analytu mezi rozpouštědlem a matricí (69) (72).

Zrychlená extrakce rozpouštědlem

Zrychlená extrakce rozpouštědlem je metodou využívající rozpouštědla nad atmosférickým bodem varu, jež jsou vlivem vyššího tlaku udržovány v kapalném stavu. Technika byla poprvé použita pro izolaci látek z životního prostředí. Původní název této

extrakční techniky byl ASE (accelerated solvent extraction), avšak v literatuře je také uváděno i PSE (pressurized solvent extraction) a jiné zkratky. Extrakce probíhají při teplotách 50-200 °C a tlacích do 20 MPa, tím se zvyšuje účinnost extrakcí. Extrakce je časově nenáročná a snadno proveditelná, avšak získává se hrubý extrakt, který je třeba ještě přečistit (66).

Mikroextrakce

V dnešní době se používají techniky, kde je úsilí o snížení extrakční doby, minimum rozpouštědla, zjednodušení a automatizace v provedení metody. Mezi mikroextrakční techniky se řadí mikroextrakce kapalnou fází (LPME – liquid phase microextraction) a tuhou fází (SPME – solid phase microextraction).

Mikroextrakce tuhou fází je metodou založenou na rovnovážné extrakci látek ze vzorku stacionární fází, jež je umístěna na povrchu tenkého vlákna z křemene. Stacionární fáze pokrývající křemenné vlákno má polymerní charakter (polydimethylsiloxan, polyakrylát). Mikroextrakci můžeme provést dvěma způsoby, přímou sorpcí z roztoku nebo sorpcí plynné fáze nad vzorkem (Head-Space). K tepelné desorpci dochází v nástřikovém prostoru plynového chromatografu, kde je látka nadávkována na kolonu a následně analyzována. Výhodou metody je jednoduchost, neboť je zde eliminace úprav vzorku, možnost opakovatelného použití vlákna, kompatibilita s nástřikovým prostorem plynového chromatografu, zatímco nevýhodou je křehkost vlákna a dále kompetitivní sorpce (66) (73).

Mikroextrakce kapalnou fází spočívá v zavěšení kapky organického rozpouštědla na hrot mikrostříkačky. Látky ze vzorku jsou extrahovány do kapky rozpouštědla, jež je po ukončení extrakce natažena opět do stříkačky a extrakt je vhodnou metodou analyzován. Princip extrakce je stejný jako u extrakce kapalina-kapalina, ale je zde miniaturizace v jedné kapce, tudíž je snížena spotřeba organického rozpouštědla (66) (73).

Extrakce pevnou fází

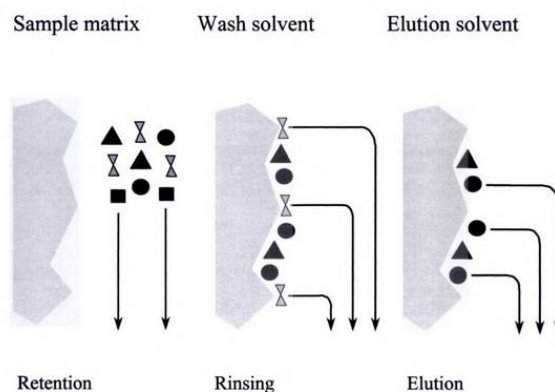
Extrakce pevnou fází je široce využívanou laboratorní technikou pro kapalně vzorky již od 70. let 20. století (74). Technika slouží k izolaci vybraných analytů z mobilní fáze. Analyty jsou převedeny na pevnou fází, kde jsou zadrženy během procesu vzorkování

a následně jsou z pevné fáze získány elucí rozpouštědlem nebo tepelnou desorpčí. Analyt se nejčastěji váže na pevnou fázi iontovou výměnou nebo adsorpcí. SPE lze využít jak k extrakci, tak k prekoncentraci nebo přečištění vzorku. Extrakce pevnou fází byla původně vyvinuta jako doplňující metoda k extrakci kapalina-kapalina. Nyní patří mezi často používané metody v oblastech chemie, a to ochrany životního prostředí, ve farmaceutické, klinické, potravinové a průmyslové chemii. SPE bývá často řazena před chromatografickou separaci z toho důvodu, že prodlužuje životnost chromatografické kolony a zlepšuje kvalitativní i kvantitativní analýzu. Extrakce pevnou fází oproti L–L extrakci poskytuje lepší kvantitativní extrakci s nižší spotřebou rozpouštědla, metoda je jednoduchá a časově nenáročná a může být i automatizována. Nevýhodou oproti L–L extrakci je vyšší cena, jež je určena sorbentem v kolonce, kterou lze použít většinou jednou (75) (76).

SPE se používá k přípravě kapalných vzorků a k extrakci netěkavých či méně těkavých sloučenin. Pokud se vzorky vyskytují v pevné fázi je nutno tyto vzorky předem extrahovat a následně nadávkovat do SPE kolonky. SPE má široké uplatnění při analýze látek s různými chemickými strukturami díky různě modifikovaným sorbentům v kolonkách.

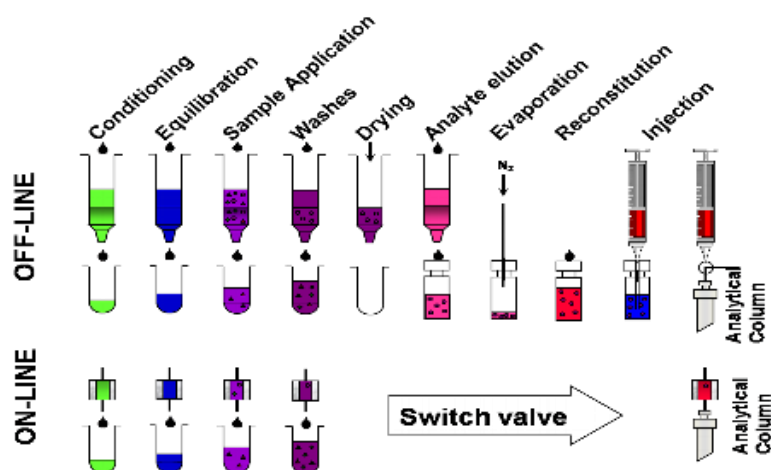
V 90. letech 20. století byla objevena alternativní forma založena na diskové technologii. Extrakční disky jsou vyráběny z teflonu a tvoří tenké membrány se specifickým sorbentem. Výhody extrakčních disků jsou spojovány s nízkou spotřebou rozpouštědla, vysokou účinností a reprodukovatelností (77).

Provedení SPE se skládá z několika kroků, prvním krokem je kondicionace kolonky. Kolonka se promyje předepsaným rozpouštědlem, tím se aktivuje stacionární fáze pro interakci se vzorkem a poté rozpouštědlem, které je podobné vzorku. Příkladem je fáze C₁₈, ta se aktivuje methanolem a pokud je vzorek ve vodném prostředí, tak následuje úprava prostředí vodou. Druhým krokem je nadávkování vzorku, kde dochází k selektivní sorpci v závislosti na druhu stacionární fáze. Třetím krokem je promytí kolonky patřičným rozpouštědlem, vymytí zůstatku matrice vzorku a vysušení. Posledním krokem je eluce analytu rozpouštědlem, dochází k desorpci a k vymývání analytu ze stacionární fáze. Vzniklý eluát je jímán a dále upravován. Obrázek 26 ukazuje, co se odehrává na stacionární fázi během extrakce analytů, promytí a eluce analytů. Během určitého kroku dochází vždy k retenci, vymytí nebo eluci sloučeniny (78).



Obrázek 26: Jednotlivé kroky odehrávající se na stacionární fázi (78).

SPE je metodou již je možno dělit na on-line (přímou) a off-line (nepřímou) techniku. On-line SPE je přímo spojena s analytickou kolonou pomocí přepínacího ventilu. Tímto spojením je umožněno volit tok mobilní fáze analytickou kolonou anebo pootočením ventilem do druhé polohy, desorbovat tak zachycený analyt a vymýt jej do analytické kolony. Off-line SPE je realizována za použití různých kolonek, tyto kolonky jsou plněny sorbentem. Extrakt analytu je následně sbírán, upraven a dávkován do analytické kolony. Niž uvedený obrázek 27 ukazuje jednotlivé kroky při on-line a off-line SPE (78).

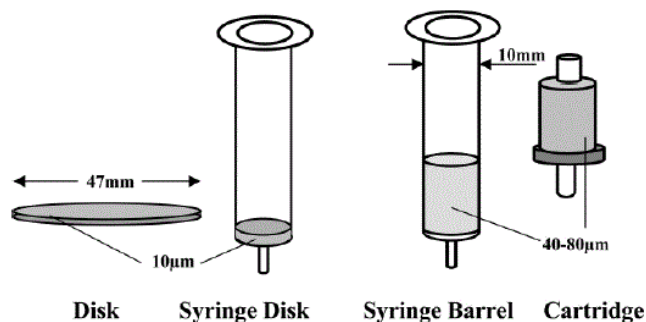


Obrázek 27: Jednotlivé kroky při on-line a off-line SPE (79).

Vzhledem k tvaru se může jednat o kolonky, disky, pipetovací špičky či jamková plata. Kolonka je sestavena ze skleněné avšak častěji plastové cartridge, ve které je mezi dvěma fritami umístěn sorbent. Hlavním úkolem frit je zamezení ucpání kolonky. Kolonky jsou vyráběny

s různou velikostí objemů (př. 1, 3, 6, 12, 20, 60 ml), hmotností sorbentů (př. 0,05, 0,5, 1, 2, 5, 10 g). Hmotnostmi sorbentů jsou dány parametry kolonek – minimální eluční objem či kapacita sorbentů. Kolonky se používají při rutinních analýzách u nepříliš znečištěných vzorků a jsou limitovány omezeným průtokem. Tj. dáno malým průměrem průtočné plochy a výškou sloupce sorbentu. Vlivem průtoku rozpouštědla mohou vznikat kanálky, které vedou k nejednotnému průtoku, to je důsledkem nižší sorpční kapacity a reprodukovatelnosti (80) (81).

Novější formou SPE je disk se standartním průměrem 47 mm umístěný do cartridge. Tento disk je tvořen tenkou teflonovou membránou naplněnou určitým typem sorbentu. Oproti kolonce zde není omezení v průtokové rychlosti a disk je vhodný pro vzorky s velkými objemy. Průtočná plocha umožňuje kapalině prostupovat kratší dráhou a tím se snižuje i tvorba kanálků. Ve srovnání s SPE kolonkami disky obsahují menší množství sorbentu (10ky-100ky mg), což umožňuje používat menší objemy rozpouštědel k eluci (Obr. 28) (77).



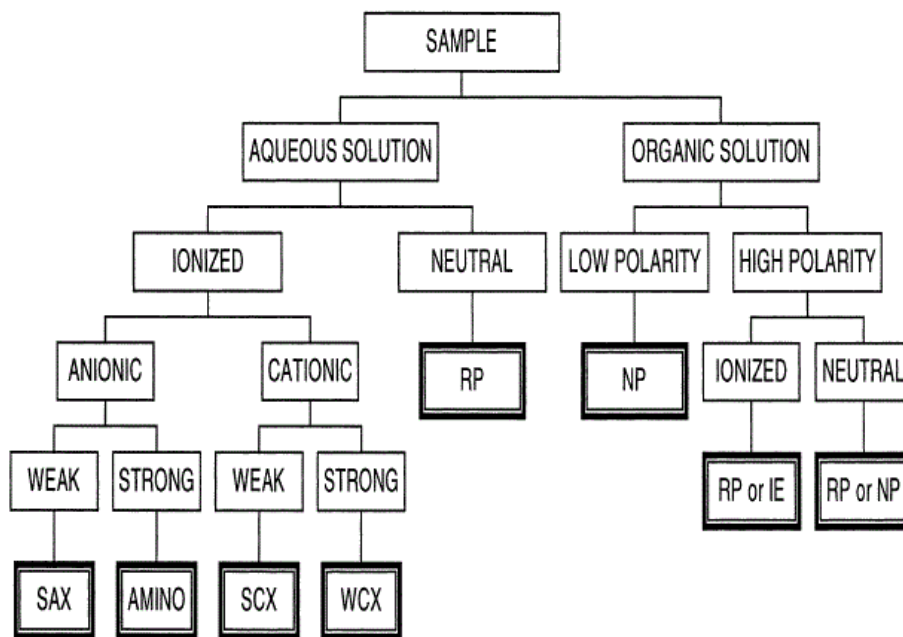
Obrázek 28: Disk a cartridge SPE (77).

Při extrakci pevnou fází je používáno mnoho různých stacionárních fází, které umožňují separaci analytů podle různých chemických vlastností. Většina stacionárních fází jsou na bázi silikagelových částic se zakotvenou funkční skupinou, avšak sorbentem SPE může také být alumina, aktivní uhlí a jiné. Zakotvenou funkční skupinou mohou být různě dlouhé řetězce uhlovodíků, v tomto případě se jedná o reverzní SPE. Zatímco sorbenty s polárními funkčními skupinami (př. -CN), se nazývá normální SPE. Je-li zakotvenou skupinou na C₁₈ kvartérní amoniová sůl nebo -NH₂ skupina, pak se jedná o anion výměnnou SPE, v případě kation výměnné SPE je funkční skupinou -SO₃H či -COOH. Tabulka 7 stručně popisuje používané adsorbenty, analyty, které zachytí na daném adsorbentu a používaná eluční rozpouštědla (78) (82).

Tabulka 7: Stručný přehled SPE extrakcí, adsorbentů, stanovovaných analytů a elučních rozpouštědel (82).

Extrakce	Adsorbent	Analyt	Eluční rozpouštědlo
Nepolární extrakce	C18, C8, Fenyl	pesticidy, antibiotika, aflatoxiny, kofein, nikotin, vitamíny	hexan, dichlormetan, acetonitril, alkoholy
Polární extrakce	silikagel, -NH ₂ , -CN, -diol	antibiotika, pesticidy, steroidy, vitamíny, aflatoxin	Dichlormethan, trichlormetan, ethylacetát, alkoholy, voda
Kationtová výměna	-SO ₃ H, -COOH	aminokyseliny, chlorofyl, PCB	kyseliny, roztoky solí, pufrý
Aniontová výměna	- NH ₂	organické kyseliny, kofein, sacharin	zásady, roztoky solí, pufrý
Nepolární extrakce Na polymeru	PS-DVB	enoly a pesticidy z vody, PAH z olejů	ethylacetát, metanol, acetonitril

Vhodná volba sorbentu je shrnuta na obrázku 29, rozpouštědlo vzorku a typ analytu poskytují logickou úvahu pro výběr SPE kolonky. Ukázka použití schématu je znázorněna na organické sloučenině, jež je rozpustná v organických rozpouštědlech a obtížně rozpustné v rozpouštědlech střední polaritý, na základě schématu jsme schopni vybrat SPE kolonku s vhodným sorbentem (80).

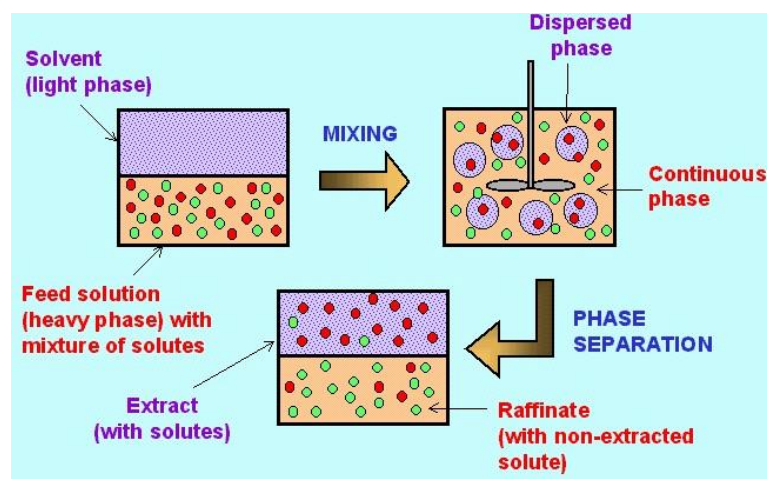


Obrázek 29: Schéma k výběru vhodného sorbentu SPE kolonky (RP-reverzní fáze, NP- normální fáze, IE-iontově-výměnná, SAX-silný aniontový měnič, SCX-silný kationtový měnič, WCX-slabý kationtový měnič) (80).

Extrakce kapalina-kapalina

Základní porozumění L-L extrakce bylo popsáno v literatuře již v roce 1964. Extrakční procesy jsou obecně aplikovány k separaci směsí, které nemohou být řešeny destilací, a to kvůli tomu, že destilační teploty jsou příliš vysoké. Metoda umožňuje získávat cílové sloučeniny, oddělovat rušivé látky, nečistoty a izolovat stopová množství (83).

Principem L-L extrakce je přechod rozpuštěné látky vyskytující se v jedné kapalně fázi do druhé kapalně fáze, kdy mezi rozpouštědly dochází k ustanovení rovnováhy, což je znázorněno na obrázku 30. Rozpouštědla se spolu nemísí a utvářejí se dvě ostře ohraničené fáze. Pokud je k dispozici vhodné organické rozpouštědlo, extrakce se stává účinnou metodou k separaci. Jedno z nejčastěji používaných rozpouštědel je voda či vodný roztok, kdežto druhé rozpouštědlo je organické a je s vodou nemísitelné. Avšak je dobré zmínit, že tyto systémy nemusí být pouze vodné. Může se jednat o nevodný systém př. roztavený kov. Účinnost extrakce je dána rozdělovacím koeficientem, čím vyšší rozdělovací koeficient, tím vyšší je účinnost a organická fáze obsahuje vyšší podíl extrahované složky (84).



Obrázek 30: Ukazuje kapalnou fázi obsahující požadovanou sloučeninu, která má být oddělena. Přidáním druhé fáze a promíslením dochází k přerozdělení požadované látky mezi fáze a po ustavení rovnováhy může dojít k oddělení fází (85).

Extrakce můžeme rozdělit dle způsobu provedení na jednostupňové, kdy se ustaluje pouze jedna rovnováha mezi fázemi. Další způsob provedení je mnohostupňový, ustálení rovnováhy je opakováno vícekrát v jednotlivých krocích. Kontinuální způsob provedení je takový, že fáze jsou neustále v kontaktu. Možné kritérium dělení závisí také na charakteru extrahované látky. Organické látky mohou být extrahovány vhodně zvoleným organickým rozpouštědlem, jehož polarita je podobná polaritě látky. Anorganické látky je třeba před extrakcí upravit reakcí s chelatačním činidlem, vzniklý chelátový komplex může být nenabitý a tak snadno přecházet do organického rozpouštědla nebo může vystupovat jako nabitá částice, která tvoří iontový asociát, který je již extrahovatelný (86).

L-L a SPE extrakce jsou běžně používanými postupy k analýze polyfenolů a jednoduchých fenolů. Techniky jsou stále velmi používané kvůli své jednoduchosti, účinnosti a širokému rozsahu využití. Běžně používanými extrakčními rozpouštědly jsou alkoholy, aceton, diethyl ether a další. Avšak velmi polární fenolické kyseliny (skořicové kyseliny) nemohou být extrahovány čistými organickými solventy, a proto je potřebné k jejich kvantitativní extrakci tyto látky extrahovat směsí rozpouštědel, př. voda-aceton. Měně polární rozpouštědla (hexan, chloroform, benzen, dichlormethan) jsou vhodnější k extrakci nepolárních látek rostlinné matrice – oleje, steroly, chlorofyl. Důležitým extrakčním faktorem je pH, teplota, poměr objemu vzorku, rozpouštědla a doba extrakce (19).

L-L Extrakce polyfenolických sloučenin z olejů

Extrakce kapalina-kapalina je vhodnou analytickou metodou pro stanovení polyfenolických sloučenin v potravinových matricích. Rostlinné oleje se skládají z triglyceridů, tvořících přibližně 90-99 % oleje a nezmýdelnitelných frakcí 0,4-5 % (87). Rostlinné oleje obsahují mnoho polárních sloučenin. Mezi tyto sloučeniny patří alifatické alkoholy, steroly, a také antioxidanty, kde jsou řazeny fenolické sloučeniny. Fenolické sloučeniny jsou v olejových matricích přítomny ve stopovém množství a z toho důvodu musí být látky před separací (GC, HPLC) a detekcí extrahovány. Při extrakci dochází k částečnému přečištění a odstranění nepolárních sloučenin od cílových analytů. S ohledem na různorodost chemických struktur fenolických sloučenin jsou v literatuře popsány a optimalizovány různé postupy k extrakci polárních analytů obsažených v olejových matricích, příkladem polárních sloučenin jsou kyseliny, méně polární flavony či lignany. Častým problémem při analýze rostlinných olejů je vysoký obsah nepolárních sloučenin, které jsou v nadbytku a mohou kontaminovat jednotlivé části separačního zařízení. Během extrakce tyto nepolární složky přecházejí z větší části do nepolárního organického rozpouštědla a složky polární do polárního rozpouštědla. Studie (87) (88) (89) zabývající se touto problematikou používá extrakční metodu LLE, SPE a často tyto metody i srovnávají.

Studie (87) popisuje extrakci fenolických sloučenin metodou LLE a SPE. K experimentu bylo použito pro LLE 1 g vzorku. Dále byl ke vzorku přidán 1 ml hexanu, tato směs byla extrahována 2 ml 60 % methanolu ředěného vodou. Pro SPE bylo použito 6 g vzorku, k navážce bylo přidáno 6 ml hexanu. Směs byla nadávkována na SPE kolonku, promyta hexanem a k eluci analytu bylo použito 10 ml MeOH:H₂O (80:20, v/v). Během optimalizace podmínek v LLE se došlo k závěru, že nejvyšší extrakční účinnost poskytuje směs 2 ml MeOH:H₂O (70:30, v/v) a to díky vyšší polaritě fenolických sloučenin obsažených ve vzorku. Účinnost extrakce byla také ovlivněna délkou trvání centrifugace. Centrifugace po dobu 3 minut poskytovala vyšší plochy píků oproti centrifugaci trvající 1 minutu. Použité metody byly následně porovnány. Kapalinová extrakce poskytla oproti SPE lepší výtěžnost fenolických frakcí. Výtěžnost LLE se pohybovala v rozmezí 92 - 105 % a SPE 88 – 104 %.

Další studie (89) zabývající se srovnáním účinností kapalinové extrakce s SPE s různými typy sorbentů (C₈, C₁₈, Diol) při analýze fenolických frakcí zjistila, že nejvyšší výtěžnosti bylo dosaženo při použití kapalinové extrakce (92,1 %), následovala extrakce

pomocí C₁₈-SPE s výtěžností 74%, Diol-SPE s 64,5% a C₈-SPE s 51%. Při SPE bylo použito 1 gramu vzorku, ke kterému bylo přidáno 6 ml hexanu. Následně směs byla nanesena na SPE kolonku, promyta 6 ml hexanu k odstranění nepochopitelných frakcí oleje. Dále byly sloučeniny s různou polaritou postupně vymyty přidavky jednotlivých rozpouštědel (acetonitril, methanol, methanol:voda (1:1)), sesbírány do sběrné nádoby, odpařeny a poté použity k analýze.

2.1.7.2 Metody stanovení fenolických látek

Fenolické látky je možné stanovit více způsoby. Mezi běžně používané metody stanovení patří jak plynová, tak kapalinová chromatografie, nicméně další možnosti stanovení jsou i elektromigrační metody.

Chromatografie na tenké vrstvě (TLC) a Papírová chromatografie (PC)

Chromatografie na tenké vrstvě a papírová chromatografie jsou metodami méně používanými při analýze polyfenolických látek, avšak analýza hraje významnou roli při stanovení fenolických kyselin v přírodních produktech. TLC a PC chromatografie jsou užitečné pro rychlé stanovení rostlinných extraktů před detailní analýzou instrumentálními technikami. Běžně používanou stacionární fází pro TLC je silikagel, polyamid či celulóza. K detekci se využívá UV záření při vlnové délce 350-365 nm. Hlavním cílem TLC je určit pouze kvalitativní zastoupení, ne kvantitativní (90).

Vysokoúčinná (HPLC) a ultraúčinná (UPLC) kapalinová chromatografie

Pro stanovení fenolických látek bylo navrženo mnoho analytických metod, nicméně většina byla založena na kapalinové chromatografii s UV spektrometrem. Před několika lety se kapalinová chromatografie stala dominantní technikou v separaci a charakterizaci fenolických sloučenin. HPLC technika umožňuje simultánně separovat všechny analyzované komponenty hromadně i s možnými deriváty nebo degradačními produkty. V mnoha případech je možné stanovit nízké koncentrace analytů i v přítomnosti interferujících komponent. Výhodou kapalinové chromatografie je vynechání derivatizačního kroku oproti plynové

chromatografii, avšak GC-MS poskytuje přesnější výsledky. Pomocí HPLC můžeme stanovit jak kvalitativní, tak kvantitativní složení analytu (91).

K separaci fenolických látek se používají kolony s reverzní fází, umožňují separovat odlišné skupiny fenolických sloučenin. Výhradně používaným typem stacionární fáze je C_{18} s délkou kolony 100 – 250 mm a vnitřním průměrem od 3,9 do 4,6 mm (19). Velikost částic je obvykle 3-10 μm , avšak v poslední době se zlepšilo chromatografické provedení díky ultraúčinné kapalinové chromatografii (UPLC, UHPLC). UPLC používá novější typy monolitických kolon s délkou 30 – 250 mm, vnitřním průměrem 1-4,6 mm a velikostmi částic pod 2,5 μm a tím dochází ke zvýšení účinnosti, zlepšení rozlišení a citlivosti oproti HPLC. Při použití menších částic se zvyšuje průtoková rychlost a zkracují se tak časy analýzy (19) (69).

Acetonitril, methanol jsou často používanými mobilními fázemi při kvantifikaci fenolických sloučenin. V mnoha případech acetonitril poskytuje lepší rozlišení a kratší časy analýz, nicméně methanol je často preferován z důvodu nižší toxicity a prodloužení životnosti kolony. Jako mobilní fáze může být také použit ethanol, tetrahydrofuran a 2-propanol. Velkou pozornost si vyžaduje určité pH mobilní fáze, které by mělo být v rozmezí 2-4, aby se zabránilo ionizaci fenolů při jejich identifikaci. Z toho důvodu mobilní fáze také obsahuje kyselinu octovou, či mravenčí. Pufry s nízkým pH se mohou také používat jako mobilní fáze, příkladem je citrátový, fosfátový pufr. K analýze fenolických sloučenin se může používat jak isokratická, tak gradientová eluce, avšak běžněji používanější je gradientová eluce (19) (92).

Fenolické sloučeniny mohou být identifikovány za použití UV-VIS a detektoru diodového pole (DAD) při vlnové délce 190-380 nm. Dalším možným detektorem je hmotnostní spektrometr ve spojení s HPLC. Ionizační technikou v hmotnostní spektrometrii může být elektrosprej (ESI-MS), laserová desorpce/ionizace za účasti matrice (MALDI-MS), či ionizace urychlenými atomy (FAB-MS). Spojení HPLC-MS poskytuje vysokou citlivost a dosažení specifity vzhledem k hmotě. HPLC-NMR a UHPLC jsou modernějšími technikami k identifikaci bioaktivních sloučenin z přírodních produktů (69) (93). Trendem při analýze fenolických sloučenin je hydrofilní interakční chromatografie. HILIC se stala populární kvůli vyšší kompatibilitě aplikované mobilní fáze ve spojení s MS a přesnější analýze polárních sloučenin ve složitějších maticích (94).

Elektromigrační metody

Používanými technikami ke stanovení polyfenolických látek jsou kapilární elektroforéza (CE), kapilární zónová elektroforéza (CZE) a micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC). CE je technika s vysokou rozlišovací schopností a účinností, je vhodná k identifikaci nabitých molekul s nízkou a střední molekulovou hmotností. K analýze se používají borátové či fosfátové pufrы, vnitřní průměr kapiláry je v rozmezí 50-100 μm , napětí 10-30 kV a dávkované objemy 10-50 nl (19). Velkou výhodou je malá spotřeba vzorku, z toho důvodu je potřeba techniku spojit s citlivým detektorem. Detekce se obvykle provádí za použití UV detektoru, ale je možné využít i elektrochemický či hmotnostní detektor (69).

Plynová chromatografie

Plynová chromatografie je další možnou technikou, pomocí níž lze separovat, identifikovat a kvantifikovat fenolické sloučeniny. Principem plynové chromatografie je separace složek obsažených ve vzorku, jež jsou převedeny do plynné fáze, aniž by docházelo k rozkladu analyzovaných látek. Vzorek je nadávkován do proudu plynu a v koloně unášen mobilní fází, kde dochází k interakci vzorku se stacionární fází. Látky se separují na základě různé retence se stacionární fází (95). GC je hlavní technikou k analýze zejména fenolických kyselin v přírodních produktech. Kvantifikace polyfenolických látek z potravinové matrice zahrnuje přečištění, odstranění lipidové části z extraktu a uvolnění sloučenin z glykosidů či esterů alkalickou nebo bazickou hydrolyzou. Posledním krokem úpravy vzorku je převedení látek na těkavější deriváty. Fenolické sloučeniny obsahují -OH skupiny, ty jsou schopné vytvářet vodíkové můstky. Vlivem vodíkových můstků dochází ke zvyšování teplot varu, což má za následek snížení těkavosti fenolických sloučenin (19) (96).

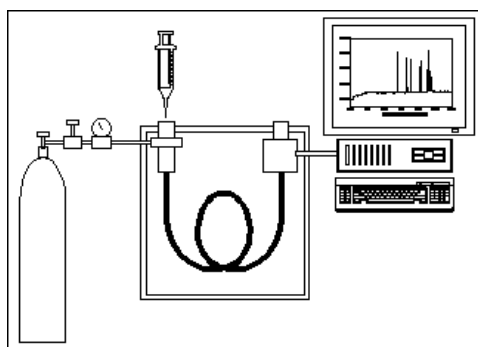
Během derivatizačním kroku se používá mnoho reagenčních činidel k modifikaci a vytvoření těkavých derivátů převedením hydroxylové skupiny na ester či ether. Příkladem používaných derivatizačních činidel je TMCS (trimethylchlorsilan), DMDCS (dimethyldichlorosilan), HMDS (hexamethyldisilazan), BSTFA (N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid). Derivatizace probíhá jak v kyselém (TFA - trifluoroctová kyselina), tak alkalickém prostředí, kde dochází k deprotonaci hydroxylové skupiny. Derivatizační krok zahrnuje rozpouštění vysušeného extraktu v pyridinu nebo ethylendiaminu (baze) a přidání

derivatizačního činidla, př. TMS. Reakce probíhá v rozmezí teplot 60-115°C, po dobu 20-60 minut (19) (69) (96).

Kolony používané pro stanovení a kvantifikaci fenolických sloučenin jsou křemenné kapiláry v rozmezí délek 9-50 m, s vnitřním průměrem 100 - 320 μm a tloušťkou filmu stacionární fáze 0,1-0,5 μm . K detekci fenolických sloučenin je možné používat FID (plameno-ionizační detektor), avšak rozšířenějším detektorem je MS (hmotnostní spektrometr). Plynová chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií poskytuje citlivější a selektivnější výsledky analýz (19) (92) .

Instrumentace

Plynový chromatograf (Obr. 31) se skládá z tlakové lahve obsahující nosný plyn, regulátoru průtoku, dávkovacího zařízení, kolony, detektoru a vyhodnocovacího zařízení. Nosný plyn je inertní látka, která by se měla chovat ideálně. Helium má blízko k chování ideálního plynu, nicméně je drahé. Používané nosné plyny jsou uchovávány v tlakových lahvích, tyto lahve mohou být naplněny dusíkem, heliem, vodíkem nebo argonem. Nosné plyny by neměly obsahovat organické nečistoty, vlhkost a kyslík, z toho důvodu je třeba čistící zařízení. Průtok nosného plynu je zajišťován regulačním systémem (98) (99).



Obrázek 31: Základní schéma plynového chromatografu (97).

Dávkovací zařízení (injekční stříkačky, autosamplery) mají za úkol co nejrychleji zavést vzorek do kolony. Dávkovací prostor je termostatován, aby docházelo k rychlému zplynění vzorku. Použitá teplota je vyšší, než pracovní teplota kolony. Důležitou částí plynového chromatografu je chromatografická kolona obsahující stacionární fázi. U kolon

se rozeznávají dva typy, a to kolony náplňové (plněny sorbentem nebo nosičem se zakotvenou fází) nebo kapilární (tenký film zakotvený na vnitřním povrchu kapiláry – WCOT, SCOT, PLOT). Materiál používaný k výrobě kolon je buď sklo, nebo nerez, avšak často používanými kolonami v dnešní době jsou křemenné kapiláry kolony. Jak kolona, tak detektor jsou uloženy v termostatovaném prostoru, aby vzorek setrval v plynném stavu. Při určitých analýzách se využívají teplotní režimy, při nichž se pracovní teplota mění v závislosti na čase (99) (100).

Detektory se dělí na základě různých kritérií, příkladem mohou být detektory koncentrační a hmotnostní či destruktivní a nedestruktivní. Složky vycházející z kolony mají určité vlastnosti, na základě těchto vlastností (tepelná vodivost, ionizace radioaktivním zářením, atd.) jsou látky detekovány. Používaným detektorem pro svoji univerzálnost je tepelně vodivostní detektor (TCD), plameno-ionizační detektor (FID) je univerzálním detektorem pro měření organických látek, avšak na sloučeniny neobsahující spalitelný uhlík je necitlivý, detektor elektronového záchytu je obzvláště citlivý k halogenovaným sloučeninám (sloučeniny s vysokou afinitou k elektronům). Příkladem dalších typů detektorů mohou být plameno-ionizační detektory s alkalickým kovem (AFID), heliový ionizační detektor (HeD) nebo hmotnostní spektrometrický detektor (MS) (99).

Při analýze jednotlivých složek potravin se často využívá spojení GC-MS, hmotnostní detektor je dostatečně citlivý a selektivní, ve srovnání s konvenčními detektory, dále poskytuje nejvíce kvalitativních informací o analyzovaném vzorku. V hmotnostní spektrometrii se molekuly analyzovaného vzorku převádějí na ionty a na základě rozdílných poměrů m/z dochází k jejich separaci. Výsledné spektrum poskytuje záznam relativních intenzit sledovaných iontů. Ionizace molekul probíhá v iontovém zdroji, kde dochází k převodu neutrálních molekul na částice nesoucí náboj. Ionizační techniky se dělí na měkké (molekula získává menší množství energie, minimum fragmentů) a tvrdé (dostatek vnitřní energie, fragmentované ionty). Ionizace probíhá jak za sníženého tlaku (EI – elektronová ionizace, CI – chemická ionizace, MALDI – ionizace laserem za účasti matrice), tak za tlaku atmosférického (ESI – ionizace elektrosprejem, APPI – ionizace za atmosférického tlaku, APCI – chemická ionizace za atmosférického tlaku). Elektronová ionizace patří mezi tvrdé ionizační techniky, molekula získává velký nadbytek vnitřní energie a dochází k fragmentaci iontů. Výhodou tvrdé ionizační techniky je snadné zjištění o jakou látku se jedná, protože knihovny EI spekter obsahují přes 600 tisíc spekter látek (95).

K oddělení iontů dle jejich poměru m/z se používají hmotnostní analyzátory. Kvadrupólový analyzátor pro svoji nízkou cenu a jednoduchost je obvykle spojován s plynovou chromatografií. Kvadrupól se skládá ze čtyř kovových tyčí s určitou polarizací, na něž je vkládáno střídavé napětí. Ion, který je přiváděn do kvadrupólu, začne oscilovat (v závislosti na poměru U/V) a pokud je oscilace pro daný ion stabilní, prochází až do detektoru. Mezi další hmotnostní analyzátory patří průletový analyzátor (TOF), iontová past (IT), orbitrap, magnetický sektorový analyzátor a iontová cyklotronová rezonance (101) (102).

2.1.8 Derivatizace

Derivatizace je proces, při kterém dochází k modifikaci sloučeniny, při němž vzniká nová sloučenina s vlastnostmi vhodnějšími k detekci v GC nebo jiných analytických instrumentálních metodách. Derivatizace v GC může být definována jako technika, jež v první řadě modifikuje funkcionalitu analytu, aby byla umožněna separace jednotlivých látek. Modifikovaný analyt je v tomto případě nazýván derivátem. Derivát může mít blízkou či podobnou strukturu, ale ne stejnou jako původně modifikovaná chemická sloučenina. Sloučeniny termolabilní, s nízkou těkavostí vykazují nereprodukovatelné plochy píků v GC. Sloučeniny, které poskytují horší odezvu na určitý typ detektoru, mohou být s jinými funkčními skupinami lépe detekovatelné. Příkladem je chlor, který zlepšuje odezvu ECD detektoru. Kromě zlepšení odezvy detekce, derivatizace může zlepšit rozlišení při koeluci sloučeniny a překrývajícími se píky (103).

Požadavkem pro analýzu pomocí GC je těkavost vzorku. Derivatizace poskytuje polárním látkám dostatečnou těkavost a eluci při určitých teplotách bez tepelného rozkladu vzorku. Sloučeniny obsahující funkční skupiny s aktivními atomy vodíku (-SH, -OH, -COOH, -NH₂) mají tendenci tvořit vodíkové vazby, tyto vodíkové vazby ovlivňují těkavost sloučenin, interakci s materiálem kolony a tepelnou stabilitu (104). GC se používá k separaci těkavých sloučenin a derivatizace umožňuje modifikaci funkčních skupin analýzu vybraných sloučenin, které by pomocí GC nemohly být stanoveny. Derivatizační proces jak zvyšuje, tak i snižuje těkavost sloučenin, dále snižuje adsorpci analytu v systému, poskytuje lepší odezvu detektoru a píkovou symetrii (105).

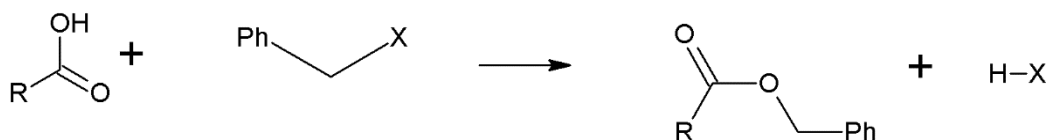
Derivatizační činidla, jsou látky, které modifikují sloučeninu za vzniku nové sloučeniny s vlastnostmi vhodnými k analýze GC a LC. Vhodně vybraná derivatizační činidla by měla

splňovat následující kritéria: reagenty by měly produkovat více než 95% derivátů, neměly by zapříčiňovat žádné změny sloučenin během tvorby derivátů, přispívat ke ztrátě vzorku během reakce a měli by produkovat deriváty, které nebudou reagovat s chromatografickou kolonou, navíc by měly vznikat deriváty, které jsou stabilní (103).

Derivatizační reakce používané v plynové chromatografii se obecně dělí na tři typy, a to na reakce alkylační, acylační a silylační. Prostřednictvím těchto reakcí lze vysoce polární látky (organické kyseliny, hydroxysloučeniny...) převést na sloučeniny vhodné k analýze plynovou chromatografií (104).

2.1.8.1 Alkylace

Alkylace je nejčastěji používaným krokem derivatizace nebo se využívá jako ochrana určitých vodíkových atomů ve vzorku. Reakce představuje nahrazení aktivního atomu vodíku alifatickým či aromatickým zbytkem. Reakce probíhá za přítomnosti katalyzátoru, jímž je anorganická kyselina. Níže zmíněná reakce (rovnice 1) ukazuje obecnou reakci esterifikace (103).



Rovnice 1: Obecná reakce esterifikace, X = halogen, -OH, R = alkylová skupina (103).

Hlavní využití reakce je přeměna organických kyselin na estery, které poskytují lepší chromatogramy než volné kyseliny. Alkylační reakce může být také použita při přípravě etherů, thioetherů či thioesterů atd. Obecně platí, že alkylační produkty jsou méně polární než výchozí látky, protože aktivní vodík byl nahrazen alkylovou skupinou. Vzniklé alkylové estery vynikají stabilitou, mohou být izolovány a skladovány delší dobu.

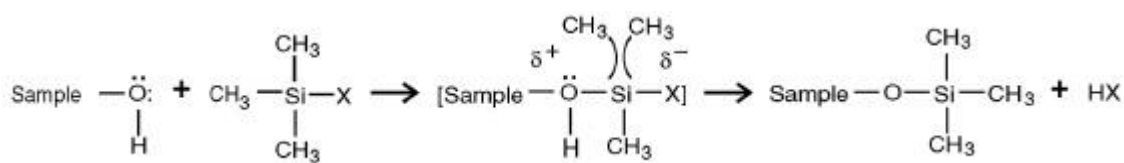
Běžná derivatizační činidla používaná pro alkylační reakci jsou dialkylacetal, diazoalkan, pentafluorobenzyl bromid (PFBBBr), benzylbromid, BF₃ v methanolu či butanolu a tetrabutylamonium hydroxid (TBH). Alkylační činidla lze použít samostatně k vytvoření

př. esterů, amidů nebo také mohou být využity ve spojení s acylačními či silylačními činidly. Reakční podmínky mohou být jak silně kyselé, tak silně bazické a reakce probíhají při určitých teplotách a časech. Nevýhodou těchto činidel je jejich toxicita (104).

2.1.8.2 Silylace

Silylace je převládající metodou derivatizace, kdy vznikají těkavé analyty a z toho důvodu je vhodnou reakcí k analýze netěkavých analytů pomocí GC. Silylace znamená zavedení silylové skupiny do molekuly, náhradou za aktivní vodík dimethylsilylem $[\text{SiH}(\text{CH}_3)_2]$, t-butyldimethylsilylem $[\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3]$, chloromethyldimethylsilylem $[\text{SiCH}_2\text{Cl}(\text{CH}_3)_2]$ a zdaleka nejčastěji trimethylsilylem $[\text{Si}(\text{CH}_3)_3]$. Náhrada aktivního atomu vodíku silylovou skupinou snižuje polaritu sloučeniny. Mnoho hydroxy a amino sloučenin jsou netěkavé nebo nestabilní při 200-300 °C, avšak po silylaci je možné tyto látky analyzovat. Vzniklé deriváty jsou těkavější a stabilnější, tudíž jsou získávány užší a symetrické píky (103) (106).

Silylační reakce je řízena dobře odstupující skupinou, což znamená, že skupina má nízkou bazicitu, schopnost stabilizace a negativní náboj v tranzitním stavu. Silylace zahrnuje nahrazení aktivního atomu vodíku ($-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{NH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$) trimethylsilylovou skupinou. Obecné schéma tvorby derivátu trialkylsilylu je zobrazeno rovnicí 2 (107).



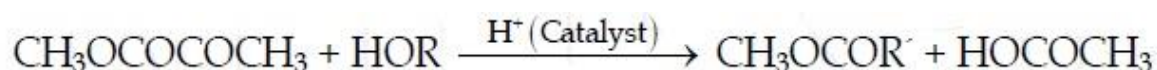
Rovnice 2: Obecný reakční mechanismus pro vznik trialkylsilylového derivátu (103).

Při derivatizaci je třeba dbát na to, aby jak vzorky, tak rozpouštědla byla vysušená a rozpouštědla v nejvyšší čistotě. Silylační činidla jsou obecně citlivá na vlhkost. Reaktivita funkčních skupin roste od alkoholů, fenolů, karboxylů, aminů k amidům/hydroxylům.

Derivatizační činidla používaná při silylaci jsou hexamethyldisilazan (HMDS), trimethylchlorosilan (TMCS), trimethylsilylimidazol (TSMI), bistrimethylsilylacetamid (BSA), bistrimethylsilyltrifluoroacetamid (BSTFA), N-methyl-N-t-butyldimethylsilyltrifluoroacetamid (MSTFA), trimethylsilyldiethylamin (TMS-DEA) a další. Reakční činidla mohou reagovat jak s alkoholy, tak s kyselinami za vzniku trimethylsilyl estrů či etherů. Tyto deriváty jsou těkavé a většině případů snadno oddělitelné. Reakce jsou ovlivnitelné jak rozpouštědly, tak přidávanými katalyzátory (př. pyridin), jež zvyšují reaktivitu činidla. Silylace poskytuje derivatizaci v širokém výběru sloučenin a následnou analýzu v GC (104).

2.1.8.3 Acylace

Derivatizace acylací je typem reakce, kdy je acylová skupina zavedena do organické sloučeniny. V případě karboxylové kyseliny reakce zahrnuje acylaci a ztrátu hydroxylové skupiny. Sloučeniny obsahující aktivní atom vodíku mohou být převedeny na estery, thioestery či jiné deriváty. Acylace je vhodnou reakcí pro vznik těkavých derivátů z vysoce polárních látek (př. cukry). Acylace zlepšuje stabilitu sloučenin, které jsou termolabilní. Rovnice 3 ukazuje acylační reakci mezi acetanhydridem a alkoholem (103).



Rovnice 3: Reakce acetanhydridu s alkoholem (R=alkyl) reaguje za vzniku esteru a kyseliny octové (103).

Acylace nabízí určité benefity při GC analýze. Zlepšuje stabilitu analytu ochranou nestabilních skupin, poskytuje těkavost látkám, jako jsou sacharidy či aminokyseliny, jež mají mnoho polárních skupin a jsou netěkavé a teplem rozložitelné. Halogenované deriváty jsou detekovatelné při nízkých hladinách ECD detektorem (105).

Běžně používaná činidla pro acylaci jsou fluoroacylimidazol, fluoroanhydridy, N-methylbis(trifluoroacetamid) (MBTFA), pentafluorobenzoyl chlorid (PFBCl) a pentafluoropropanol (PFPOH) a další. Činidla jsou dostupná jako anhydridy, acyl deriváty nebo acyl halidy. Acyl deriváty a halidy jsou vysoce reaktivními sloučeninami (104).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie, přístroje, pomůcky

Použitá rozpouštědla a chemikálie, diethylether (Lach-Ner), pentan (Lach-Ner), hexan (Lach-Ner), heptan (Lach-Ner), methanol (Lach-Ner), chloroform (Lach-Ner), aceton (Lach-Ner), pyridin (Lach-Ner), N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (Merck), hydroxid draselný (Lach-Ner) a kyselina sírová (Lach-Ner). Standardní látky byly zakoupeny ze Sigma-Aldrich, k. vanilová, k. kumarová, k. protokatechová, k. syringová k. ferulová, k. gallová, k. kávová, k. sinapová, resveratrol, α -tokoferolacetát, δ -tokferol, vitamín E, katechin, quercetin.

Analýzy byly provedeny plynovým chromatografem Agilent 7890A s hmotnostním detektorem Agilent 5975C (Agilent, Palo Alto, CA, USA) s kolonou HP5-MS, 30m x 0,25mm x 0,25 μ m. Byly použity analytické váhy, SPE kolonky (Strata Si-1 Silica (55 μ m, 70 Å), 500 mg/3 ml, Phenomenex, USA), dále blokový termostat (Stuart SBH 130) a laboratorní centrifuga (Eppendorf centrifuge 5702).

Použité pomůcky – centrifugační zkumavky, pipety, kádinky, vialky.

3.2 Pracovní postup

3.2.1 Příprava, derivatizace a analýza vzorku

3.2.1.1 L-L extrakce

K naváženému vzorku oleje (1 g) v centrifugační zkumavce bylo přidáno 2 ml heptanu. Směs byla protřepána po dobu 1 minuty, následně bylo přidáno 1 ml methanolu. Směs byla promíchána a po dobu 5 minut docházelo k ustavování rovnováhy, následně byla směs centrifugována (3 min, 4400 ot./min.), po skončení centrifugace došlo k rozdělení dvou fází. Horní, methanolvá fáze byla odebrána do vialky a odpařena do sucha při 70 °C pod proudem dusíku.

3.2.1.2 SPE

1 gram oleje byl hydrolyzován s 0,5 ml 50% KOH a 10 ml destilované vody při 80 °C po dobu 30 minut. Vzorek po hydrolýze byl ochlazen a bylo přikápnuto fenolftaleinu pro zkoušku alkalického prostředí, jež bylo zneutralizováno 26% H₂SO₄. Po neutralizaci byl přidán nadbytek 26% H₂SO₄ (200 µL). Směs byla následně extrahována 2 ml směsí diethylether-pentan v poměru 1:1. Směs byla po dobu 1 minuty protřepávána a dále centrifugována po dobu 3 minut. Ze vzorku byla odebrána organická fáze a odpařena. K odparku bylo přidáno 5 ml chloroformu. SPE kolonka byla kondicionována 5 ml směsí methanol:chloroform v poměru 1:4 ml. Na kolonku byl nanesen vzorek rozpuštěný v chloroformu. Kolonka byla propláchnuta 1 ml methanolu. Eluce byla provedena 5 ml acetonu a 5 ml methanolu. Eluát byl odpařen do sucha při 70 °C pod proudem dusíku.

3.2.1.3 Derivatizace

Po odpaření organických rozpouštědel bylo do vialek napipetováno 75 µL pyridinu a 75 µL BSTFA. Vialky byly zazátkovány a derivatizace probíhala při 90 °C po dobu 30 minut. Po ochlazení byly vzorky doplněny 850 µL hexanu a analyzovány GC–MS.

3.2.1.4 Analýza vzorků

Cílové analyty byly analyzovány v režimu monitorování celkového iontového proudu v rozsahu m/z 29 – 800 (TIC) a v režimu monitorování selektivních iontů (SIM). Data byla zaznamenána od 6. minuty. Analýza byla rozdělena v režimu SIM1 do 6 skupin. Ve skupinách byly analyzovány fenolické kyseliny, resveratrol a tokoferoly (Tab. 8). V režimu SIM2 byly použity stejné parametry z tabulky 8 u 1. – 5. skupiny. Navíc byly přidány 2 skupiny, které mají rozdíl v iontech oproti SIM1. Nově přidané skupiny obsahující katechin (m/z : 355, 368; analýza od 27,00 min.) a quercetin (m/z : 559, 647; analýza od 28,50 min.) (Tab. 8).

Vzorky byly analyzovány za podmínek 50 °C - 2min - 10 °C/min - 320 °C - 20min, nástřik: 1 µl, dávkovací pulz 140 kPa, 0,2 min. Teplota nástřikového prostoru: 340 °C. Konstantní průtok He: 0,9 ml/min.

Tabulka 8: Parametry nastavení SIM1 a SIM2

SIM1/SIM2		
Skupina	m/z	Čas [min]
1	193, 297, 308	6,00
2	327, 338	19,00
3	308, 396, 458	19,60
4	338, 368, 396	20,50
5	429, 444	23,00
SIM1		
6	430, 474, 488	27,00
SIM2		
6	355, 368	27,00
7	559, 647	28,50

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

Analýza byla zaměřena na antioxidanty, látky spojované s prospěšnými účinky na lidské zdraví. Sloučeniny zodpovědné za antioxidační aktivitu jsou polyfenoly. Typickým zástupcem polyfenolických sloučenin je resveratrol. Při biosyntéze resveratrolu jsou hlavními prekurzory fenolické kyseliny. Tyto fenolické kyseliny jsou velmi rozšířenými látkami v lidské potravě. Zmiňované kyseliny byly také zastoupeny v analyzovaných vzorcích olejů. Do studie byl dále zařazen vitamín E, který patří mezi významné lipofilní antioxidanty obsažené ve velké míře v analyzovaných vzorcích. Vitamín E taktéž spadá do skupiny fenolických sloučenin, protože obsahuje hydroxylové skupiny vázané na aromatické jádro, které jsou pro skupinu charakteristické.

4.1 L-L extrakce

Vhodnou metodou pro izolaci a stanovení volných forem fenolických kyselin a fenolických sloučenin (vitamín E, resveratrol, katechin, quercetin) je kapalinová extrakce methanol – heptan. Heptan byl použit k přečištění vzorků a odstranění většiny nepolárních balastních látek, především triacylglycerolů, které zůstávají rozpuštěné v heptanové fázi, zatímco polárnější, (poly)fenolické látky přechází ochotně do methanolové fáze. Při extrakci docházelo k určitým ztrátám, protože nelze přesně odebrat methanolovou fázi z mezifázi.

Tabulka 9 charakterizuje jednotlivé fenolické kyseliny a resveratrol pomocí retenčních časů a hodnot m/z dominantních iontů použitých pro kvantifikaci, dále ukazuje návratnost těchto kyselina a resveratrolu při kapalinové extrakci vzorku rýžového oleje s přidavkem standardů. Návratnost se pro většinu sledovaných látek pohybuje v rozmezí 90 – 113 %. Gravimetricky bylo zjištěno, že účinnost odstranění nepolárních složek matrice (triacylglycerolů) je 95,7 %. V heptanové fázi zůstává 95,7 % balastu a v methanolové fázi zůstává 4,3 % balastu.

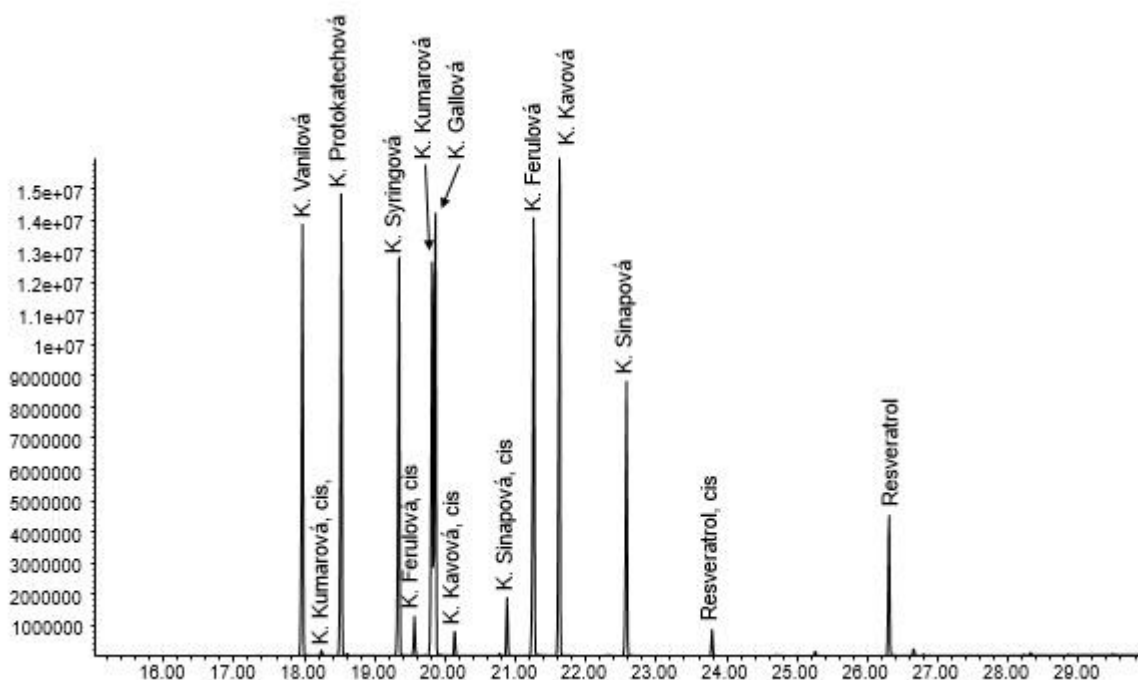
Tabulka 9: Návratnost fenolických sloučenin při kapalinové extrakci.

Název sloučeniny	m/z	t [min]	LLE %
K. Vanilová	297	17,96	97
K. Kumarová, cis	308	18,23	86
K. Protokatechová	193	18,52	96
K Syringová	327	19,23	91
K. Ferulová, cis	338	19,56	64
K. Kumarová	308	19,8	93
K. Gallová	458	19,86	93
K. Kávová, cis	396	20,13	56
K. Sinapová, cis	368	20,88	66
K. Ferulová	338	21,24	93
K. Kávová	396	21,61	90
K. Sinapová	368	22,57	95
Resveratrol	444	26,31	113

V tabulce 10 jsou vypsány a charakterizovány použité standardy fenolických sloučenin pomocí retenčních časů a poměrů m/z . Na obrázku 32 je chromatografický záznam standardů fenolických sloučenin.

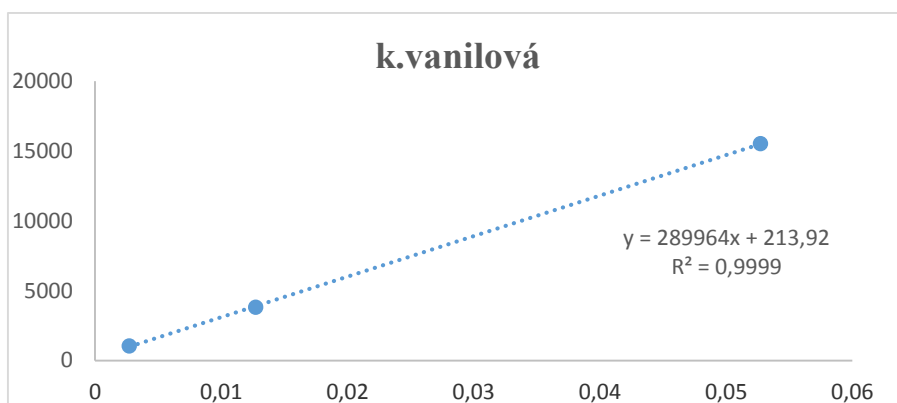
Tabulka 10: Charakteristika standardních látek.

Sloučenina	t_r [min]	m/z
K. vanilová	17,96	297
K. kumarová, cis	18,23	308
K. protokatechová	18,52	193
K. syringová	19,33	327
K. ferulová, cis	19,56	338
K. kumarová	19,80	308
K. gallová	19,86	458
K. kávová, cis	20,13	396
K. sinapová, cis	20,88	368
K. ferulová	21,24	338
K. kávová	21,61	396
K. sinapová	22,57	368
Resveratrol, cis	23,79	444
Resveratrol	26,31	444
Katechin	27,27	368
δ -tokoferol	27,55	475
β -tokoferol	28,13	488
γ -tokoferol	28,22	488
α -tokoferol	29,15	502
Quercetin	29,25	647



Obrázek 32: Chromatografický záznam standardních látek.

Ke stanovení množství jednotlivých fenolických sloučenin byly použity kalibrační závislosti. Metodou standardních přídavek o koncentracích 0; 0,01; 0,05 $\mu\text{g/g}$ u kyselin a 0; 1; 5; 10 $\mu\text{g/g}$ u vitamínu E, 0; 0,01; 0,1; 1; 10 $\mu\text{g/g}$ u katechinu a quercetinu byly zjištěny koncentrace fenolických sloučenin přítomných v rýžovém oleji. Nalezené koncentrace a známé koncentrace standardních přídavek byly využity k sestavení kalibrační závislosti pro určení koncentrací jednotlivých látek v ostatních vzorcích olejů. Na obrázku 33 je ukázka kalibrační závislosti jedné z fenolických kyselin, v tomto případě kyseliny vanilové a její rovnice přímky potřebná ke kvantifikaci sloučeniny v olejích. V tabulce 11 jsou vypsány jednotlivé rovnice přímek potřebné ke kvantifikaci fenolických sloučenin v ostatních vzorcích.



Obrázek 33: Kalibrační závislost kyseliny vanilové.

Tabulka 11: Rovnice kalibračních přímek fenolických sloučenin.

Sloučenina	Rovnice přímky
K. Vanilová	$y = 289964x + 213,92$
K.Kumarová, cis	$y = 216813x - 29,957$
K. Protokatechová	$y = 352771x + 541,48$
K Syringová	$y = 245893x + 123,6$
K. Ferulová, cis	$y = 126639x + 1,8171$
K. Kumarová	$y = 176455x - 9,018$
K. Gallová	$y = 16180x - 30,952$
K. Kávová, cis	$y = 60909x - 4,0909$
K. Sinapová, cis	$y = 155588x + 51,204$
K. Ferulová	$y = 211403x + 684,07$
K. Kávová	$y = 188271x - 304,24$
K. Sinapová	$y = 155588x + 51,204$
Resveratrol	$y = 110485x + 272,7$
α -Tokoferol	$y = 6733,2x + 255380$
β -Tokoferol	$y = 6733,2x + 255380$
γ -Tokoferol	$y = 6733,2x + 255380$
δ -Tokoferol	$y = 6733,2x + 255380$
Katechin	$y = 138949x - 13677$
Quercetin	$y = 953x + 101,84$

Tabulka 12 ukazuje koncentrace ($\mu\text{g/g}$) fenolických sloučenin ve vzorcích olejů. Mezi analyzované vzorky olejů patří arašídový a hroznový (zn. Olitalia), olivový (zn. Franz Josef) a olivový za studena lisovaný, sezamový (zn. Albert Bio), slunečnicový (zn. Vegetol), řepkový (zn. Lukana), kokosový a rýžový olej (zn. Basso). Olivový a sezamový olej obsahovaly vyšší

koncentrace fenolických sloučenin z analyzovaných olejů. Ze zjištěného množství fenolických sloučenin v jednotlivých olejích lze pozorovat značnou citlivost analýz. Analyzované oleje obsahovaly velké množství vitamínu E, obzvláště α -tokoferolu a γ -tokoferolu, které jsou v potravinách často rozšířené. Slunečnicový olej obsahoval největší množství α -tokoferolu, a to 1,36 g/kg. Řepkový olej obsahoval největší množství γ -tokoferolu, a to 1,07 g/kg.

Tabulka 12: Množství fenolických sloučenin ve vzorcích olejů.

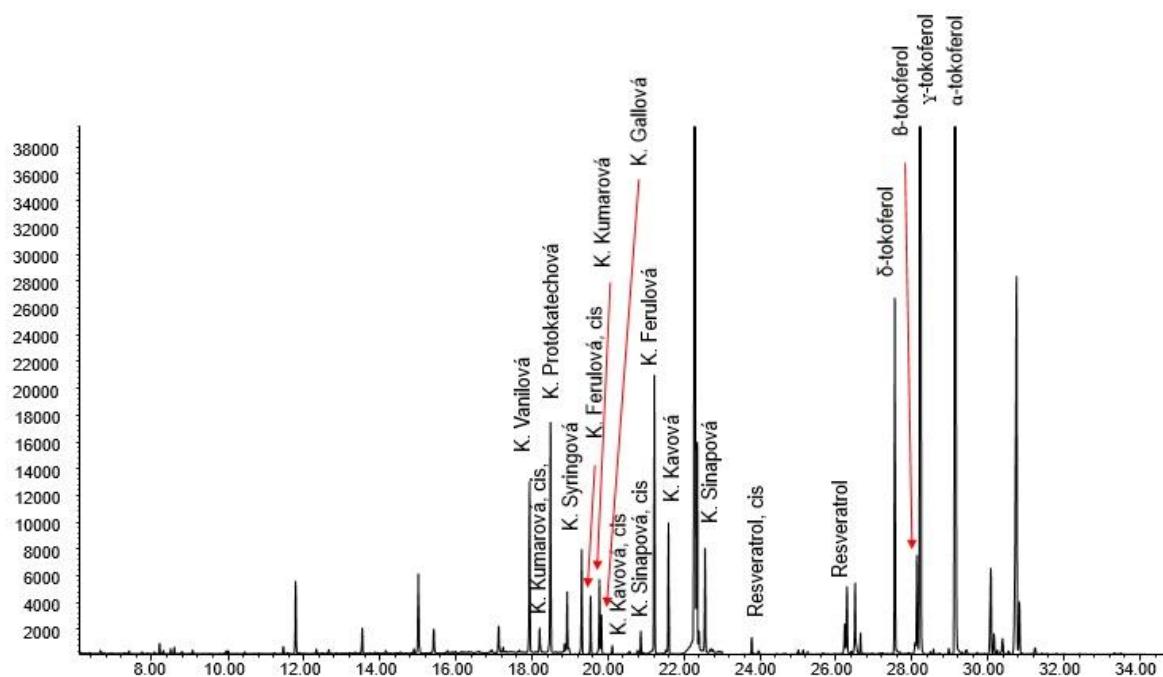
	Arašídový olej [μg/g]	Hroznový olej [μg/g]	Olivový olej [μg/g]	Sezamový olej [μg/g]	Slunečnicový olej [μg/g]
K. Vanilová	0,0037	0,0025	0,3335	0,3494	0,0048
K. Kumarová, cis	0,0008	0,0009	0,0642	0,0017	0,0008
K. Kumarová	0,0018	0,0008	0,4444	0,0225	0,0017
K. Protokatechová	N.D.	0,0112	2,3689	0,1502	0,0095
K. Syringová	0,0020	0,0072	0,0104	0,0418	0,0055
K. Ferulová, cis	0,0040	0,0013	0,0440	0,0611	0,0019
K. Ferulová	0,0033	0,0025	0,0527	0,1210	0,0022
K. Sinapová, cis	0,0022	0,0003	0,0010	0,0165	0,0039
K. Sinapová	0,0033	0,0053	0,0082	0,1977	0,0069
K. Gallová	0,0071	0,0031	0,0079	0,0286	0,0054
K. Kávoá, cis	N.D.	0,0001	0,0067	0,0020	0,0005
K. Kávoá	0,0001	0,0004	0,0052	0,0053	0,0007
Resveratrol, cis	0,0077	0,0036	0,0119	0,0567	0,0116
Resveratrol	0,0014	0,0022	0,0041	0,0007	0,0010
α -tokoferol	302,9	321,1	411,5	3,705	1363
β -tokoferol	20,88	7,316	9,598	1,115	75,64
γ -tokoferol	513,5	147,1	53,24	568,1	8,923
d-Tokoferol	45,48	24,56	3,103	25,48	2,231

Pokračování tabulky 12: Množství fenolických sloučenin ve vzorcích olejů.

	Slunečnicový olej [μg/g]	Olivový olej [μg/g]	Kokosový olej [μg/g]	Rýžový olej [μg/g]	Řepkový olej [μg/g]
K. Vanilová	0,0019	0,3812	0,0105	0,0436	0,0146
K. Kumarová, cis	0,0009	0,2088	0,0010	0,0006	0,0021
K. Kumarová	0,0028	1,0482	0,0019	0,0021	0,0010
K. Protokatechová	0,0015	0,3144	0,0041	0,0012	0,0117
K. Syringová	0,0003	0,0426	0,0069	0,0020	0,0497
K. Ferulová, cis	N. D.	N. D.	0,0060	0,0711	0,0093
K. Ferulová	N. D.	N. D.	0,0065	0,2608	0,0071
K. Sinapová, cis	0,0060	N. D.	0,0067	0,0001	0,0235
K. Sinapová	0,0185	0,0010	0,0251	0,0048	0,1110

K.Gallová	0,0009	0,0004	0,0007	0,0002	0,0086
K. Kávová, cis	0,0007	0,0020	0,0004	0,0005	0,0053
K. Kávová	0,0013	0,0028	0,0002	0,0011	0,0037
Resveratrol, cis	0,0010	0,6121	0,0024	0,0007	0,0021
Resveratrol	N. D.	1,2233	0,0005	0,0007	0,4667
α -tokoferol	82,79	1,239	0,0147	34,54	425,0
β -tokoferol	0,0605	1,986	0,0163	3,206	4,520
γ -tokoferol	38,82	3,593	0,2195	44,99	1077
δ -tokoferol	0,0078	0,0097	0,0453	3,266	34,34

Na obrázku 34 je chromatogram odpovídající analýze reálného vzorku rýžového oleje s přídavkem 0,05 $\mu\text{g/g}$ fenolických kyselin a resveratrolu a 10 $\mu\text{g/g}$ tokoferolů.



Obrázek 34: Rýžový olej s přídavky 0,05 $\mu\text{g/g}$ kyselin a 10 $\mu\text{g/g}$ tokoferolů.

Do experimentu byly přibrány i hroznové oleje vylisované ze zrníček odrůdových vín (Ryzlink Rýnský, Rulandské Šedé, Pálava, Frankovka, Zweigltreibe, Dornfelder) popsanych v tabulce 13. U těchto hroznových olejů bylo navíc zjišťováno množství katechinu, který byl v největším množství obsažen v oleji ze zrníček hroznového vína Rulandského Šedého (3,3

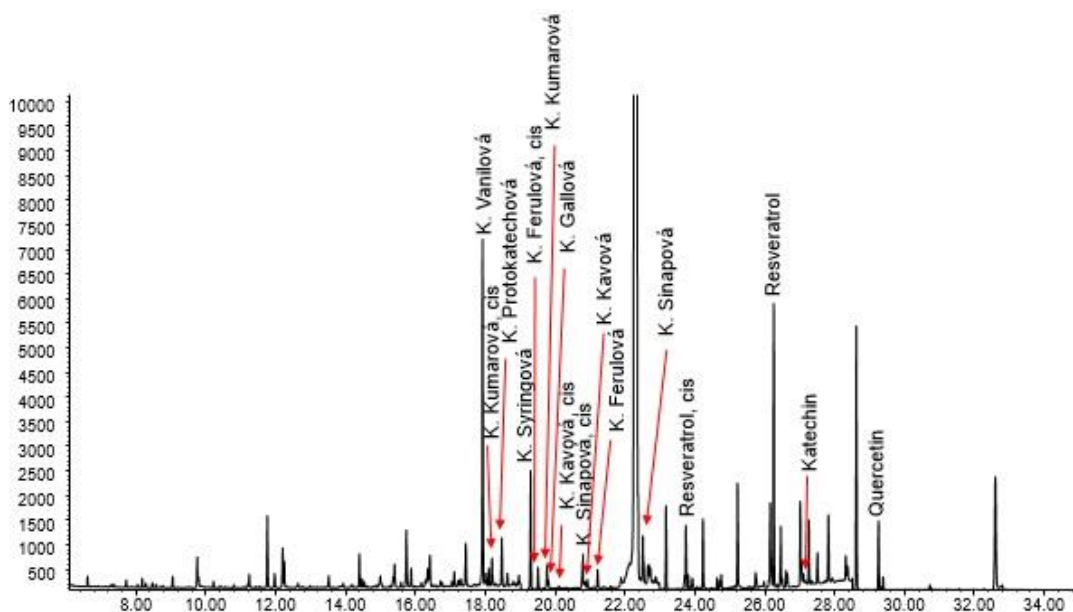
mg/kg) a quercetinu, obsaženého v největším množství v oleji ze zrníček hroznového vína Dornfelder (17,4 mg/kg). Hroznové oleje obsahovaly větší množství resveratrolu oproti výše zmíněným olejům. Největší množství resveratrolu bylo nalezeno v olejích ze zrníček hroznového vína Rulandského šedého a Frankovky.

Tabulka 13: Množství fenolických sloučenin v olejích ze zrníček odrůdových vín.

	Ryzlink Rýnský [μg/g]	Rulandské Šedé [μg/g]	Pálava [μg/g]
K. Vanilová	0,0207	0,0363	0,0082
K. Kumarová, cis	0,0034	0,0019	0,0020
K. Kumarová	0,0462	0,0302	0,0155
K. Protokatechová	0,0303	0,0249	0,0111
K. Syringová	0,0049	0,0224	0,0205
K. Ferulová, cis	0,0047	0,0039	0,0071
K. Ferulová	0,0061	0,0103	0,0086
K. Sinapová, cis	0,0012	0,0085	0,0016
K. Sinapová	0,0127	0,2003	0,0105
K. Gallová	0,0265	0,2103	0,0185
K. Kávová, cis	N. D.	0,0008	0,0002
K. Kávová	0,0010	0,0023	0,0011
Resveratrol, cis	0,4370	0,0262	0,4469
Resveratrol	0,6182	1,4773	0,3117
α-tokoferol	24,50	66,96	102,4
β-tokoferol	0,6686	1,332	1,532
γ-tokoferol	13,04	16,98	36,73
δ-tokoferol	0,8874	0,2363	2,216
Katechin	0,0603	3,303	0,1587
Quercetin	0,2298	0,1028	0,0409

Pokračování tabulky 13: Množství fenolických sloučenin v olejích ze zrníček odrůdových vín.

	Frankovka [μg/g]	Zweigeltreibe [μg/g]	Dornfelder [μg/g]
K. Vanilová	0,2537	0,0244	0,3004
K. Kumarová, cis	0,0127	0,0021	0,0051
K. Kumarová	0,0742	0,0225	0,0469
K. Protokatechová	0,0723	0,0093	0,0437
K. Syringová	0,2122	0,0188	0,1544
K. Ferulová, cis	0,0132	0,0048	0,0105
K. Ferulová	0,0280	0,0074	0,0301
K. Sinapová, cis	0,0051	0,0008	0,0046



Obrázek 36: Chromatogram oleje ze zrníček odrůdového vína Dornfelder (SIM2).

4.2 SPE

Pro uvolnění fenolických sloučenin z vázaných forem (glykosidů, esterů, depsidů apod.) byla navržena alkalická hydrolýza s následným oddělením produktů hydrolýzy lipidové matrice pomocí extrakce tuhou fází dovolující postupné vymývání jednotlivých frakcí ze silikagelové kolonky. Postup lze aplikovat pouze na fenolické látky, které jsou dostatečně stabilní za podmínek hydrolýzy. Zejména v případě některých fenolických kyselin byly při analýze standardů pozorovány výrazné ztráty analytů během zahřívání v alkalickém prostředí. Typicky se ztráty projeví v případě 3,4-dihydroxy případně 3,4-hydroxy-methoxy disubstituovaných fenolických kyselin. V souboru sledovaných látek se jednalo o kyselinu kávovou, protokatechovou a vanilovou a dále o 3,4,5-trisubstituovanou kyselinu syringovou.

Výtěžky fenolických látek zjištěné analýzou standardů byly za těchto podmínek relativně nízké (4 – 45 %). Přesto byly celkové koncentrace nalezené metodou standardních přídavek výrazně vyšší než nalezené koncentrace volných fenolických látek. Porovnání celkového obsahu fenolických látek a koncentrace volných forem je spolu s faktorem

vyjadřujícím poměr obou hodnot uvedeno v tabulce 14. Z tabulky je zřejmé, že množství vázaných fenolických látek v některých případech až řádově převyšuje koncentrace volných forem. Vzhledem k nedostatečně prostudované stabilitě sledovaných látek během hydrolýzy a relativně nízkým výtěžkům extrakce je ovšem nutné považovat tyto výsledky za předběžné. Pro vyvození relevantních závěrů by bylo nutné metodu dále optimalizovat a podrobněji prostudovat chování a sledovaných látek a různých vázaných forem (estery, glykosidy, depsidy) za podmínek hydrolýzy a následné chromatografické (SPE) purifikace.

Tabulka 14: Porovnání LLE a SPE.

Sloučenina	LLE [$\mu\text{g/g}$] (volná forma)	SPE [$\mu\text{g/g}$] (celková konc.)	Poměr (celková/volná)
K. Kumarová, cis	0,009957	0,137943	13,9
K. Kumarová	0,011373	0,067541	6,0
K. Ferulová, cis	0,044184	0,087214	2,0
K. Ferulová	0,116373	0,193691	1,7
K. Sinapová, cis	0,003988	0,021429	5,4
K. Sinapová	0,059536	3,068605	51,5
K. Gallová	0,001461	0,063713	43,6
Resveratrol, cis	0,019580	0,197038	10,0
Resveratrol	0,003185	0,016546	5,2

5 ZÁVĚR

Diplomová práce se zabývá stanovením fenolických sloučenin v potravinách, zejména v olejích. Tato práce shrnuje dělení fenolických sloučenin, kam byl zařazen i vitamín E, který obsahuje funkční skupinu charakteristickou pro tyto sloučeniny. V teoretické části je popsán výskyt fenolických sloučenin, chemické vlastnosti, pozitivní vliv sloučenin na lidské zdraví a možnost jejich stanovení. V praktické části je pozornost věnována resveratrolu, fenolickým kyselinám, vitamínu E, katechinu, quercetinu - látkám velmi rozšířeným v lidské potravě.

K analyzovaným vzorkům olejů (arašídový, hroznový, olivový, olivový za studena lisovaný, sezamový, slunečnicový, řepkový, kokosový, rýžový) byly přiřazeny i oleje ze zrníček odrůdových hroznových vín (Ryzlink Rýnský, Rulandské Šedé, Pálava, Frankovka, Zweigeltrebe, Dornfelder). V práci je ukázána návratnost fenolických sloučenin. Metodou standardních přídavek bylo zjištěno množství jednotlivých látek v analyzovaných olejích. Oleje ze zrníček odrůdových vín obsahovaly větší množství resveratrolu (0,22 – 1,47 mg/kg) oproti výše zmíněným olejům, které obsahovaly až o dva řády nižší koncentrace. Použitou extrakční metodou pro stanovení množství jednotlivých fenolických sloučenin byla kapalinová extrakce. K uvolnění vázaných fenolických kyselin byl použit hydrolyzační krok a následně SPE k odstranění produktů hydrolýzy. Při hydrolýze docházelo u určitých kyselin k jejich rozkladu a u některých kyselin docházelo k uvolnění z vázaných forem. Byl pozorován i nárůst resveratrolu, který mohl být zapříčiněn hydrolyzačním krokem a v budoucnu by se tato skutečnost mohla ověřit.

6 LITERATURA

1. Jeandet, P.; et al. Metabolic Engineering of Yeast and Plants for the Production of the Biologically Active Hydroxystilbene, Resveratrol. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2012**, 1–14.
2. Slanina, J.; et al. Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. *Chem. Listy* **2004**, 98, 239–245.
3. Velíšek, J.: *Chemie potravin*. Osis, Praha 2009, ISBN 978-80-86659-17-6.
4. Haslam, E.: *Practical polyphenolics: From structure to molecular recognition and physiological action*. The press syndicate of The University of Cambridge, Cambridge 1998, ISBN 0-521-46513-3.
5. Šmidrkal, J.; et al. Resveratrol. *Chem. Listy* **2001**, 95, 602–609.
6. Berger, S.; et al. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant–pathogen interactions. *J. Exp. Bot.* **2007**, 58, 4019–4026.
7. Reis Giada, M.: Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power. In *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants*, Morales-González J. A., InTech, Rijeka 2013.
8. Manach, C. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, 79, 727–747.
9. Tazzini, Nicola. Polyphenols: Definition, structure and classification. [Online] 12. Leden 2014. [Citace: 31. Leden 2016.] <http://www.tuscany-diet.net/2014/01/12/polyphenols-definition-structure-classification/>.
10. D'Archivio, M.; et al. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super. Sanità* **2007**, 43, 348–361.
11. Pandey, K. B.; et al. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Landes Bioscience* **2009**, 2, 270–278.

12. Rong, T. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients* **2010**, *2*, 1231–1246.
13. Venketeshwer R.: *Phytochemicals as Nutraceuticals - Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health*. InTech, Rijeka 2012, ISBN 978-953-51-0203-8.
14. Cortell, J. Effect of Shading on Accumulation of Flavonoid Compounds in (*Vitis vinifera* L.) Pinot Noir Fruit and Extraction in a Model System. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 8510–8520.
15. De la Rosa, L. A.; et al.: *Fruit and Vegetable Phytochemicals*. Blackwell, Iowa 2010. ISBN 978-0-8138-0320-3.
16. Mazza, G. Anthocyanins and heart health. *Ann Ist Super Sanità* **2007**, *43*, 369–374.
17. Rockenbach, I. I. Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking. *Food Res. Int.* **2011**, *44*, 897–901.
18. Mattila, P.; et al. Phenolic Acids in Berries, Fruits, and Beverages. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 7193–7199.
19. Stalikas, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 3268–3295.
20. Kyung-Hee, K.; et al. Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chem.* **2006**, *95*, 466–473.
21. Ondrejovič, M.; et al. Polyfenoly Jablk. *Chem. Listy* **2009**, *103*, 394–400.
22. Baoshan, S.; et al. Stilbenes: Quantitative extraction from grape skins, contribution of grape solids to wine and variation during wine maturation. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *563*, 382–390.
23. Ferruelo, A.; et al. Effects of resveratrol and other wine polyphenols on the proliferation, apoptosis and androgen receptor expression in LNCaP cells. *Actas Urol Esp.* **2014**, *38*, 397–404.
24. Fernández-Mar, M. I.; et al. Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review. *Food Chem.* **2012**, *130*, 797–813.

25. [Online] [Citace: 13. Únor 2016.] <http://www.tuscany-diet.net/2015/10/06/lignans-definition-chemistry-biosynthesis-metabolism-foods/>.
26. Cheynier, V.; et al. Structure and Properties of Wine Pigments and Tannins. *Am. J. Enol. Vitic.* **2006**, 57, 298–305.
27. Yasukazu, Y.; et al. Comparative study on the action of tocopherols and tocotrienols as antioxidant: chemical and physical effects. *Chem. Phys. Lipids* **2003**, 123, 63–75.
28. Imsanguana, P.; et al. Extraction of α -tocopherol and γ -oryzanol from rice bran. *LWT* **2008**, 41, 1417–1424.
29. Zingg, J. M. Vitamin E: An overview of major research directions. *Molecular Aspects of Medicine* **2007**, 28, 400–422.
30. Traber, G.; et al. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Adv. Free Radical Biol. Med.* **2007**, 43, 4–15.
31. Dolfi, S. C. Inhibitory Effects of Different Forms of Tocopherols, Tocopherol Phosphates, and Tocopherol Quinones on Growth of Colon Cancer Cells. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, 61, 8533–8540.
32. Larrick, J. W.; et al. *Gamma-tocopherol therapy for restenosis prevention*. WO2005039443 A2 6. Květen 2005.
33. [Online] [Citace: 15. Březen 2016.] <http://hplc1.sweb.cz>.
34. Chandan, K. S.; et al. Tocotrienols: Vitamin E Beyond Tocopherols. *Life Sci.* **2006**, 78, 2088–2098.
35. Du, M.; et al. Simultaneous Analysis of Tocopherols, Cholesterol, and Phytosterols Using Gas Chromatography. *Food Chemistry and Toxicology* **2002**, 67, 1696–1700.
36. [Online] [Citace: 18. Únor 2016.] <http://www.globalhealingcenter.com/benefits-of/vitamin-e-tocopherol>.
37. Tucker, J. M.; et al. Alpha-tocopherol: roles in prevention and therapy of human disease. *Biomedicine and pharmacotherapy* **2005**, 59, 380–387.
38. Rice-Evans, C. A. Antioxidant properties of phenolic compounds. **1997**, 2, 152–159.

39. Pulido, R.; et al. Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 3396–3402.
40. Kahkonen, M. P. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 3954–3962.
41. Scalbert, A.; et al. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed. Pharmacother.* **2002**, *56*, 276–282.
42. Day, A. J.; et al. Biomarkers for exposure to dietary flavonoids: a review of the current evidence for identification of quercetin glycosides in plasma. *Br. J. Nutr.* **2001**, *86*, 105–110.
43. Rechner, A. R.; et al. Colonic metabolism of dietary polyphenols: Influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radical Biol. Med.* **2004**, *36*, 212–225.
44. Hollman, P. C. H.; et al. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed. Pharmacother.* **1997**, *51*, 305–310.
45. Spencer, J. P. E.; et al. The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Lett.* **1999**, *458*, 224–230.
46. Rechner, A. R.; et al. The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radical Biol. Med.* **2002**, *33*, 220–235.
47. Rechner, A. R.; et al. Novel biomarkers of the metabolism of caffeic acid derivatives in vivo. *Free Radical Biol. Med.* **2001**, *30*, 1213–1222.
48. Dufour, C.; et al. Inhibition of the peroxidation of linoleic acid by the flavonoid quercetin within their complex with human serum albumin. *Free Radical Biol. Med.* **2007**, *43*, 241–252.
49. Scalbert, A.; et al. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2005**, *45*, 287–306.
50. Arts, I. C. W.; et al. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 317–325.
51. Pandey, K. B.; et al. Protective Effect of Resveratrol on Markers of Oxidative Stress in Human Erythrocytes Subjected to In Vitro Oxidative Insult. *Phytother. Res.* **2010**, *24*, 11–14.

52. Vitrac, X.; et al. Direct liquid chromatographic analysis of resveratrol derivatives and flavanonols in wines with absorbance and fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta* **2002**, *458*, 103–110.
53. Nardini, M.; et al. Role of dietary polyphenols in platelet aggregation. A review of the supplementation studies. *Platelets* **2007**, *18*, 224–243.
54. Aviram, M.; et al. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, *71*, 1062–1076.
55. Maeda, K.; et al. Green tea catechins inhibit the cultured smooth muscle cell invasion through the basement barrier. *Atherosclerosis* **2003**, *166*, 23–30.
56. García-Lafuente, A.; et al. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflamm. Res.* **2009**, *58*, 537–552.
57. Pirola, L.; et al. Resveratrol: One Molecule, Many Targets. *IUBMB Life* **2008**, *60*, 323–332.
58. Rizvi, S. I.; et al. Protective role of tea catechins against oxidation-induced damage of type 2 diabetic erythrocytes. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2005**, *32*, 70–75.
59. Rizvi, S. I.; et al. Insulin-Like effect of (-)epicatechin on erythrocyte membrane acetylcholinesterase activity in type 2 diabetes mellitus. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2001**, *28*, 776–778.
60. Rizvi, S. I.; et al. Anti-oxidant effect of quercetin on type 2 diabetic erythrocytes. *J. Food Biochem.* **2009**, *33*, 404–415.
61. Barone, E.; et al. Ferulic acid and its therapeutic potential as a hormetin for age-related diseases. *Biogerontology* **2009**, *10*, 97–108.
62. Rizvi, S. I.; et al. Alterations in antioxidant enzymes during aging in humans. *Mol. Biotechnol.* **2007**, *37*, 58–61.
63. Scarmeas, N.; et al. Mediterranean diet and Alzheimer disease mortality. *J. Neurol.* **2007**, *69*, 1084–1093.
64. Dai, Q.; et al. Fruit and Vegetable Juices and Alzheimer's Disease: The Kame Project. *The American Journal of Medicine* **2006**, *119*, 751–759.

65. Arranz, S.; et al. Analysis of polyphenols in cereals may be improved performing acidic hydrolysis: A study in wheat flour and wheat bran and cereals of the diet. *J. Cereal Sci.* **2010**, *51*, 313–318.
66. [Online] 4. Březen 2016. https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/zobraz_cast.pl?cast=52968.
67. [Online] 4. Březen 2016. <http://www.cyberlipid.org/extract/extr0010.htm>.
68. Nahar L.; et. al.: *Supercritical Fluid Extraction*. Humana Press, Totowa 2005, ISBN 978-1-59259-955-4.
69. Khoddami, A.; et al. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules* **2013**, *18*, 2328–2375.
70. Xuejun, P.; et al. Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. *Chem. Eng. Process.* **2003**, *42*, 129–133.
71. [Online] 4. Březen 2016. <http://www.amedis.cz/laboratorni-technika/mikrovlne-systemy/extrakce-rozpoustedlem/>.
72. Mauricio A.; et al.: *Natural product extraction: Principle and Application*. Royal Society of Chemistry, Cambridge 2013, ISBN 978-1-84973-606-0.
73. Farrukh M. A.; et al.: *Atomic absorption spectroscopy*. InTech, Rijeka 2012, 978-953-307-817-5.
74. Poole, C. F.; et al. Contributions of theory to method development in solid-phase extraction. *J. Chromatogr., A* **2000**, *885*, 17–39.
75. Fontanals, N.; et al. New materials in sorptive extraction techniques for polar compounds. *J. Chromatogr., A* **2007**, *1152*, 14–31.
76. Hennion, M. C. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *J. Chromatogr., A* **1999**, *856*, 3–54.
77. Wrobel, K.; et al. Environmentally friendly sample treatment for speciation analysis by hyphenated techniques. *Green Chemistry* **2003**, *5*, 250–259.

78. Simpson N. J. K.: *Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques, and Applications*. Basel, New York 2000, 0-8247-0021-X.
79. [Online] [Citace: 5. Březen 2016.] <http://www.ytica.es/4.html>.
80. Poole, C. New trends in solid-phase extraction. *Trends Anal. Chem.* **2003**, 22, 362–373.
81. [Online] [Citace: 5. Březen 2016.] <http://www.labicom.cz/spe-kolonky-81/>.
82. [Online] [Citace: 6. Březen 2016.] <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/extrakce.pdf>.
83. Harris, D. K.; et al. Liquid-Liquid extraction.. *Ind. Eng. Chem.* **1966**, 58, 98–103.
84. [Online] [Citace: 3. Březen 2016.] <http://www.ped.muni.cz/wchem/sm/hc/labtech/pages/extrakce.html>.
85. [Online] [Citace: 3. Březen 2016.] http://www.separationprocesses.com/Extraction/SE_Ch01.htm.
86. Hanson C.: *Recent Advances in Liquid-Liquid Extraction*. Pergamon Press, Oxford 1971.
87. Capriotti, A. L.; et al. Comparison of extraction methods for the identification and quantification of polyphenols in virgin olive oil by ultra-HPLC-QToF mass spectrometry. *Food Chem.* **2014**, 158, 392–400.
88. Pirisi, F. M.; et al. Phenolic compounds in virgin olive oil. 2. Reappraisal of the extraction, HPLC separation, and quantification procedures.. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 1191–1196.
89. Bendini, A.; et al. Liquid–liquid and solid-phase extractions of phenols from virgin olive oil and their separation by chromatographic and electrophoretic methods. *J. Chromatogr., A* **2003**, 985, 425–433.
90. Soczewinski, E.; et al. Original Research Papers - Analysis of Glycosides and Aglycones of Flavonoid Compounds by Double-Development Thin-Layer Chromatography. *Journal of planar chromatography, modern TLC* **2004**, 17, 261–263.
91. Proestos, C.; et al. Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. *Food Chem.* **2006**, 95, 44–52.
92. Robbins, R. J. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 2866–2887.

93. Pawlovska, A. M.; et al. Quali-quantitative Analyses of Flavonoids of *Morus nigra* L. and *Morus alba* L. (Moraceae) Fruits. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 3377–3380.
94. Jandera, P. Stationary phases for hydrophilic interaction chromatography, their characterization and implementation into multidimensional chromatography concepts. *J. Sep. Sci.* **2008**, *31*, 1421–1437.
95. Karasek F.W.; et al.: *Basic Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Principles and Techniques*. Elsevier Science, Amsterdam 1988, ISBN 0-444-42760-0.
96. Halket, J. M.; et al. Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS. *J. Exp. Bot.* **2005**, *56*, 219–243.
97. [Online] [Citace: 6. Březen 2016.] <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/gc.html>.
98. [Online] [Citace: 5. Březen 2016.] http://nett21.gec.jp/CTT_DATA/WMON/CHAP_4/html/Wmon-083.html.
99. Churáček J.; et al.: *Analytická chemie*. SNTL, Praha 1987.
100. [Online] [Citace: 5. Březen 2016.] <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD/hypertext/AJAOH.htm>.
101. Holčápek, M.; et al. Recent developments in liquid chromatography–mass spectrometry and related techniques. *J. Chromatogr., A* **2012**, *1259*, 3–15.
102. Holčápek, M.; et al. Basic rules for the interpretation of atmospheric pressure ionization mass spectra of small molecules. *J. Chromatogr., A* **2010**, *1217*, 3908–3921.
103. Mohd M. A.: *Advanced Gas Chromatography - Progress in Agricultural, Biomedical and industrial Applications*. Intech, 2012, ISBN 978-953-51-0298-4.
104. [Online] [Citace: 5. Březen 2016.] <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytical-reagents/derivatization-reagents.html>
105. [Online] [Citace: 5. Březen 2016.] www.restek.com
106. Lin, D. L.; et al. Chemical Derivatization for the Analysis of Drugs by GC-MS — A Conceptual Review. *J. Food Drug Analysis* **2008**, *16*, 1–10.

107. Kühnel, E.; et al. Mechanism of Methyl Esterification of Carboxylic Acids by Trimethylsilyldiazomethane. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2007**, 46, 7075–7078.