

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Bc. Kateřina Pravcová

2017

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Analýza látek s antioxidační aktivitou v medovinách

Bc. Kateřina Pravcová

Diplomová práce

2017

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Kateřina Pravcová**
Osobní číslo: **C15587**
Studijní program: **N1407 Chemie**
Studijní obor: **Analytická chemie**
Název tématu: **Analýza látek s antioxidační aktivitou v medovinách**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Rešeršně zpracujte dostupné literární prameny týkající se obsahu antioxidantů v medovinách a možností jejich analýzy.
2. Vypracujte postup pro stanovení vybraných antioxidantů ve vzorcích medoviny.
3. Výsledky kriticky zhodnoňte a diskutujte.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. Jan Fischer, CSc.

Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce:

doc. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.

Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce:

20. února 2017

Termín odevzdání diplomové práce:

12. května 2017



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2017

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

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

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 12.5.2017

Kateřina Pravcová

Poděkování:

Úvodem své diplomové práce bych chtěla poděkovat všem, kteří mi vytvořili podmínky pro její vypracování, zejména vedoucímu mé práce doc. Ing. Janu Fisherovi, CSc. za odborné vedení, cenné rady, praktické připomínky v průběhu vypracovávání této práce a za čas strávený při konzultacích a doc. Ing. Lence Česlové, Ph.D. za její vstřícnost, odborné názory, věcné připomínky a pomoc s experimentální částí diplomové práce. Další poděkování patří Ing. Miroslavě Zelené za praktické rady, technickou pomoc při experimentální části a velkou podporu. V neposlední řadě děkuji svým rodičům za to, že mi umožnili vystudovat tuto vysokou školu a za jejich podporu v průběhu celého studia.

ANOTACE

Cílem této diplomové práce bylo stanovení jednotlivých fenolických látek s antioxidační aktivitou v medovinách. Vzorky medovin byly analyzovány bez úpravy nebo byly extrahovány do směsi ethylacetát:diethylether. Pro kvantitativní stanovení byla zvolena vysokoúčinná kapalinová chromatografie v systému s obrácenými fázemi ve spojení s hmotnostním spektrometrem. Vybrané fenolické látky byly kvantifikovány a jejich obsah v extraktech byl porovnán s obsahem při analýze neupravených vzorků medovin. Zastoupení fenolických látek v medovinách bylo podobné, lišilo se jejich množství v závislosti na použitém medu či technologii výroby.

KLÍČOVÁ SLOVA

Fenolické látky, antioxidační aktivita, medoviny, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, extrakce

TITLE

Analysis of compounds with antioxidant activity in meads

ANNOTATION

The goal of this thesis was the determination of individual phenolic compounds with antioxidant activity in meads. Samples of meads were analyzed either directly without any pretreatments or with extraction step in ethyl acetate:diethyl ether extraction solution. Phenolics were analyzed by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Selected phenolic compounds were quantified and their amount found both in the non-treated samples and in the extraction-treated samples was compared. Phenolic compound profile in analyzed samples was quite similar; their amount depends on honey used and on production technology of mead.

KEYWORDS

Phenolic compounds, antioxidant activity, meads, liquid chromatography, mass spectrometry, extraction

OBSAH

1	TEORETICKÁ ČÁST	14
1.1	Fenolické látky	14
1.1.1	Fenolické látky v rostlinách.....	15
1.1.1.1	Těkavé fenoly	17
1.1.1.2	Fenolické kyseliny	17
1.1.1.3	Flavonoidy	19
1.2	Med.....	22
1.2.1	Historie	22
1.2.2	Terapeutické vlastnosti medu	23
1.2.2.1	Antimikrobiální a antibakteriální aktivita.....	23
1.2.2.2	Peroxid vodíku.....	24
1.2.2.3	Osmolarita.....	25
1.2.2.4	Kyselost	25
1.2.2.5	Antioxidační aktivita	26
1.2.2.6	Zvýšená lymfocytární a fagocytární aktivita	26
1.2.2.7	Oxid dusnatý a jeho metabolity v medu	27
1.2.2.8	Prostaglandiny	27
1.2.2.9	Tvorba protilátek	27
1.2.3	Složení medu	28
1.2.4	Klasifikace medu	28
1.2.5	Výroba medu	29
1.3	Medoviny	30
1.3.1	Historie výroby medoviny	31
1.3.2	Kvasinky používané ve výrobě medovin.....	32
1.3.3	Základní kroky výroby medovin	32

1.3.3.1	Směs med-voda a aditiva	33
1.3.3.2	Proces fermentace a postfermentační úprava	35
1.3.4	Ovlivnění kvality při výrobě medovin.....	35
1.3.5	Problémy při výrobě medovin	35
1.4	Separční a detekční techniky využívané pro analýzu fenolických látek v medu a medovinách.....	36
1.4.1	Extrakce z kapaliny do kapaliny	36
1.4.2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	37
1.4.2.1	Instrumentace v HPLC	37
1.4.2.1.1	Detektory v HPLC	39
1.4.2.2	Fázové systémy v kapalinové chromatografii	40
1.4.3	Hmotnostní spektrometrie	41
1.4.3.1	Základní instrumentace v hmotnostní spektrometrii	41
1.4.4	Spojení hmotnostní spektrometrie a vysokoúčinné kapalinové chromatografie	44
1.5	Stanovení fenolických látek v medu respektive v medovinách pomocí chromatografických a elektromigračních metod	45
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	48
2.1	Přístroje a zařízení	48
2.2	Použité chemikálie	48
2.2.1	Chemikálie	48
2.2.2	Vzorky	49
2.2.3	Standardy	50
2.3	Pracovní postup	50
2.3.1	Příprava standardů	50
2.3.2	Příprava vzorků.....	51
2.3.3	Podmínky měření	51
3	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	53

3.1	Optimalizace HPLC/MS	53
3.2	Kvantifikace fenolických látek.....	54
3.3	Kvantifikace fenolických látek ve vzorcích medovin	56
3.4	Vliv extrakce na nalezený obsah fenolických látek	57
4	ZÁVĚR.....	65
	LITERATURA.....	66
	PŘÍLOHA	

SEZNAM ZKRATEK

APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
BSTFA	N,O-bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid
CE	kapilární elektroforéza
CI	chemická ionizace
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DAD	detektor diodového pole
DESI	desorpční ionizace elektrosprejem
DHB	dihydroxybenzoová kyselina
DHBA	dihydroxybenzaldehyd
EI	elektronová ionizace
ESI	ionizace elektrosprejem
FD	flavour dilution
GC	plynová chromatografie
GC/MS	plynová chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem
HBA	hydroxybenzoová kyselina
HMF	hydroxymethylfurfural
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
HPLC/MS	vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem (high performance liquid chromatography)
ICR	iontová cyklotronová rezonance
IR	infračervené záření
IT	lineární iontová past
LC	kapalinová chromatografie
LLE	extrakce z kapaliny do kapaliny
MAE	mikrovlnná extrakce
MALDI	ionizace laserem za účasti matrice
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
MRM	multiple reaction monitoring
MS	hmotnostní spektrometrie
NP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie v systému s normálními fázemi

ORBITRAP	orbitrální past
ORAC	metoda založená na zhášení kyslíkových radikálů (Oxygen radical absorbance capacity)
PLE	zrychlená extrakce rozpouštědlem
PTFE	polytetrafluorethylen
Q	kvadrupólový analyzátor
RIC	rekonstruovaný iontový chromatogram
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie v systému s obrácenými fázemi
SFE	superkritická fluidní extrakce
SPE	extrakce tuhou fází
TBDMS	N-(terc-butyldimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamid
TIC	chromatogram celkového iontového proudu
TMS	trimethylsilyl
TOF	analyzátor doby letu
UE	ultrazvukové extrakce
UV	ultrafialová oblast
VIS	viditelná oblast

ÚVOD

Fenolické látky jsou sloučeniny, odvozené od sekundární metabolitů rostlin, které jsou charakteristické svými antioxidačními vlastnostmi. Základní struktura fenolických látek obsahuje alespoň jeden aromatický kruh, na kterém je jedna nebo více hydroxylových skupin, které jsou vázány na alifatické nebo aromatické skelety. Mohou být rozděleny podle jejich základní struktury do 10 hlavních skupin: jednoduché fenoly, fenolické kyseliny, kumariny a isokumariny, naftochinony, xantony, stilbeny, antrachinony, flavonoidy a ligniny. Mezi nejdůležitějšími třídami patří především flavonoidy a fenolické kyseliny. Ty se mohou dělit do dalších skupin. Flavonoidy se dělí na flavony, flavany, antokyany, flavanony a další. Fenolické látky se rozdělují na deriváty kyseliny benzoové a deriváty kyseliny skořicové. Fenolické sloučeniny mají různou biologickou aktivitu, ale nejdůležitější je především jejich antioxidační aktivita. Jsou schopny zachycovat reaktivní formy kyslíku v důsledku toho, že se vyznačují jako donory elektronů. Jejich antioxidační účinnost závisí nejen na počtu a umístění hydroxylových skupin, ale také na faktorech, jako je fyzické umístění, interakce s ostatními složkami a na podmínkách prostředí (například pH). Stanovení látek s antioxidační aktivitou v medovinách slouží jako parametr kvality medovin. Pokud se v medovině vyskytuje minimální množství fenolických látek, znamená to, že při výrobě této medoviny nebyl použit med. Fenolické látky lze získat přímo ze vzorků medovin nebo extrakcí do vodně-organických rozpouštědel. Nejčastěji se využívá vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou, spektrofotometrickou nebo hmotnostně spektrometrickou detekcí.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Fenolické látky

Fenolické látky jsou heterogenní skupina sloučenin, odvozených od sekundárního metabolismu rostlin. Ukazují rozmanitost od poměrně jednoduchých struktur jako jsou fenolické kyseliny či deriváty benzenu až po složitější, mezi něž patří například ligniny, antokyany, kumariny a třísloviny [1]. Fenolické látky tvoří jednu z nejvýznamnějších skupin sloučenin, jež se vyskytuje především v rostlinách a zahrnuje až 8000 známých různorodých strukturních variant [2]. Obecně platí, že fenolické látky mohou být rozděleny podle jejich základní struktury do 10 hlavních skupin: jednoduché fenoly (například fenol, kresol, thymol a orcinol), fenolické kyseliny (například kyselina galová, 3,4-dihydroxybenzoová (3,4-DHB), vanilová a syringová), kumariny a isokumariny, naftochinony, xantony, stilbeny, antrachinony, flavonoidy a ligniny. Mezi nejdůležitějšími třídami s více než 5000 popsány sloučeninami patří především flavonoidy a fenolové kyseliny (deriváty kyseliny skořicové a benzoové) [3,4].

Fenolické sloučeniny mají alespoň jeden aromatický kruh, na kterém je jedna nebo více hydroxylových skupin, které jsou vázány na alifatické nebo aromatické skelety. Fenolové sloučeniny mohou být rozděleny na flavonoidy a nonflavonoidy. Flavonoidy jsou složeny ze dvou aromatických kruhů spojených prostřednictvím kyslíku v heterocyklu. V závislosti na stupni hydrogenace a nahrazení heterocyklu mohou být dále členěny jako flavonoly, flavony, isoflavony, antokyany, flavanoly, flavanony atd. Flavonoidy se obvykle vyskytují v přírodě jako glykosidy. Dvě nejvíce typické sloučeniny z třídy nonflavonoidů jsou kyselina benzoová a kyselina skořicová, které jsou běžně označovány jako fenolové kyseliny. Mezi další běžné fenolové kyseliny patří například stilbeny, taniny a ligniny [5].

Hlavními tématy veřejného zájmu v oblasti analýzy fenolických látek jsou zejména nutriční hodnoty, sledování nebezpečných komponentů v potravinách a kontrola kvality [6]. Dalšími důležitými problémy v oblasti výživy jsou efekty růstových podmínek, zpracování, skladování, přeprava, genetika a další faktory, které se týkají chemických a biochemických složek v potravinách [7]. V posledních letech došlo ke vzrůstajícímu zájmu o funkční potraviny, což jsou potraviny, které poskytují nejen základní nutriční a energetické požadavky, ale i další fyziologické benefity [8]. Tento výraz byl poprvé použit v Japonsku v roce 1980 a byl aplikován na potraviny, které obsahovaly složky vykazující některé fyziologické výhody. V současné době je funkční potravina definována jako potravina, která vyvolává příznivý účinek na jednu nebo více fyziologických funkcí, zvyšuje psychickou

pohodu a snižuje riziko vzniku chorob. Funkčnost potravin se obvykle vztahuje k některé ze složek, které obsahuje. V současné době se upřednostňují komponenty, které mají spíše přirozený původ než syntetický. Proto jsou tyto složky běžně extrahovány z rostlin, vedlejších produktů potravin nebo z dalších odlišných přírodních zdrojů [9]. Mezi funkční složky patří i obsáhlá skupina antioxidantů. Tento druh sloučenin hraje velmi důležitou roli v nutričních hodnotách potravin (chrání proti oxidační degradaci) [10]. Zájem o antioxidační sloučeniny se stále zvyšuje, a to především kvůli jejich důležité roli v lidském zdraví. Ve skutečnosti slouží jako prevence proti různým onemocněním jako je rakovina, koronární choroby, záněty, neurologické degenerace, stárnutí a mnoho dalších [3]. U některých fenolických sloučenin byly prokázány i protizánětlivé vlastnosti. Ačkoli přesný mechanismus této protizánětlivé aktivity nebyl zcela objasněn, existuje vzájemný vztah mezi vysokým příjmem potravy bohaté právě na tyto sloučeniny a potlačení průběhu zánětlivé reakce [1,5].

Fenolické sloučeniny jsou důležité pro kvalitu potravin rostlinného původu a hrají důležitou roli při utváření organoleptických vlastností potravin a nápojů (barva, chuť a vůně). Tyto látky jsou odpovědné za barvu červeného ovoce, džusů, vína, hnědých pigmentů na potravinách prostřednictvím enzymů a chuťových vlastnostech. Zejména trpkost je připisována srážením proteinů ve slinách pomocí polyfenolů. Tento mechanismus je pravděpodobně zapojen proti jejich antinutričním efektům. Při skladování a zpracování se rostlinné fenolické látky rozkládají na různé deriváty. Zatímco metody analyzující tyto sloučeniny s nižší molekulovou hmotností jsou objeveny, analýza polymerních sloučenin zůstává stále výzvou [1].

Fenolické sloučeniny mají různou biologickou aktivitu, ale nejdůležitější je především jejich antioxidační aktivita. Jsou schopny zachycovat reaktivní formy kyslíku v důsledku toho, že se vyznačují jako donory elektronů. Jejich antioxidační účinnost v potravině závisí nejen na počtu a umístění hydroxylových skupin, ale také na faktorech, jako je fyzické umístění, interakce s ostatními složkami potravin a na podmínkách prostředí (například pH). V mnoha studiích prokázaly fenolické sloučeniny vyšší antioxidační aktivitu, ve srovnání s vitamíny a karotenoidy. Studie prokázaly důkaz antioxidační aktivity ve vitamínu E [11-13].

1.1.1 Fenolické látky v rostlinách

Fenoly jsou skupina jednoduchých chemických sloučenin široce rozšířených v přírodě. Pro rostliny mají strukturální a stavební funkci. Jejich přítomnost zaznamenáváme ve většině čerstvého ovoce a zeleniny, nebo v komplexních sloučeninách přítomných v kůře, kořenech a listech rostlin a jejich přítomnost chrání rostlinu před útokem býložravců a mikroorganismů.

Mají zodpovědnost i za chuť, vůni a barvu květů, plodů, zároveň ale slouží jako obranné látky, které chrání před škůdci, infekcí, chladem či mechanickým poškozením. Též jsou to signální látky pro rostlinnou reprodukci, podílejí se na mechanismu reakce proti stresu a na produkci kořenových nodulů, hrají roli v patogenezi, symbióze, dávají rostlinám barvu a mají obrovskou roli v interakcích se hmyzem [14]. Mezi fenolické látky v rostlinách patří skupina polyfenolů, známých jako antokyany, která je odpovědná za barvu mnoha druhů ovoce, zeleniny a květin. Předpokládá se, že 40 % všech organicky vázaných uhlíků, které se nachází v biosféře, tvoří právě fenolické struktury. Mohou se vyskytovat jak v živých, tak i odumřelých organismech, jež tvoří zásobárnu živin pro mikroorganismy. Existuje několik důležitých tříd fenolických látek, které jsou uvedené v tabulce 1 [15].

Tabulka 1: Nejdůležitější třídy fenolických látek v rostlinách.

Třída	Příklad
Jednoduché Fenoly	fenol, guajakol
Benzochinony	2,6- dimethoxybenzochinon
Hydroxybenzoové Kyseliny	k. galová, 4-hydroxybenzoová, salicylová
Acetofenony	3-acetyl-6-ethoxybenzaldehyd
Fenylloctové Kyseliny	kyselina p-hydroxyfenylloctová
Hydroxyskořicové Kyseliny	k. kávová, ferulová, p-kumarová
Fenylpropeny	myristicin
Koumariny	eskuletin
Isokoumariny	bergenon
Chromony	eugenin
Naftochinony	juglon
Xantony	mangiferin
Stilbeny	resveratrol
Anthrachinoidy	emodin
Flavonoidy	kvercetin, katechin
Isoflavonoidy	genistein
Lignany	pinosresinol
Neolignany	eusiderin
Biflavonoidy	amentoflavon
Ligniny	
Katecholové Melaniny	
Kondenzované Tanniny	

Fenoly patří mezi fytochemikálie, které hrají významnou roli při ochraně oxidačních procesů. Antioxidační vlastnosti fenolických látek mohou působit jako lapače volných radikálů, vodíkové donory, cheláty kovů a „zhašeče“ singletového kyslíku. Je třeba zdůraznit, že většina informací o fenolickém antioxidačním potenciálu pochází ze studií in vitro.

Bohužel, tyto in vitro metody často nedostatečně korelují se schopností sloučenin inhibovat oxidační poškození potravin, protože u in vitro testů nejsou brány v úvahu faktory, jako je fyzické umístění antioxidantu, jeho interakce s jinými složkami potravin a podmínky okolního prostředí [11-13].

Podle základního skeletu se struktura přírodních polyfenolů pohybuje od jednoduchých molekul, jako jsou například jednoduché fenoly (těkavé fenoly) po vysoce polymerizované látky, jako jsou kondenzované třísloviny (viz tab. 1) [15].

1.1.1.1 Těkavé fenoly

Jednoduché fenoly, jako je fenol, o-kresol, 4-ethylfenol, guajakol, 4-vinylguajakol a eugenol, byly nalezeny mezi těkavými látkách z ovoce a zeleniny. 4-vinylguaiacol je zodpovědný za chuť citrusových plodů a podílí se také na příchuti pomerančového džusu. 4-ethylguajakol, eugenol, a 4-ethylfenol patří do skupiny odorantů s vysokým zředovacím faktorem příchutě (flavour dilution, FD), které mohou sloužit k posouzení rozdílu mezi mladými a staršími víny [16].

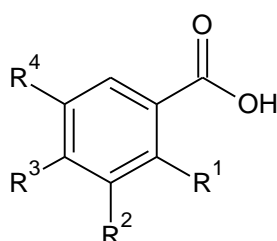
1.1.1.2 Fenolické kyseliny

Fenolické kyseliny obsahují v molekule jeden benzenový kruh, na nějž jsou navázány hydroxylové a karboxylové skupiny. Tato skupina látek může být rozdělena do dvou podskupin, podle jejich struktury, na hydroxybenzoové a hydroxyskořicové kyseliny. Do hydroxybenzoových kyselin se nejčastěji zahrnuje kyselina galová, 4-hydroxybenzoová (4-HBA), 3,4-dihydroxybenzoová, vanilová a syringová, přičemž mezi hydroxyskořicové kyseliny se řadí kyselina kávová, ferulová, p-kumarová a sinapová. Rozdíly mezi jejich deriváty spočívají v různých vzorech hydroxylací a methoxylací jejich aromatických kruhů. Jednoduché fenolické kyseliny mají schopnost silně se spojovat s primárními metabolity, jako jsou proteiny a sacharidy [1,4].

Hydroxybenzoové kyseliny

Hydroxybenzoové kyseliny mají obecnou strukturu uvedenou na obrázku 1. Jsou běžně přítomny ve vázané formě a mohou být součástí složitých struktur, jako jsou hydrolyzované taniny a ligniny. Jejich výskyt je možný i ve formě derivátů cukrů. V nižší koncentraci je zaznamenán obsah kyseliny hydroxybenzoové v potravinách a rostlinách. Kyselina galová je jedním z nejběžnějších derivátů této sloučeniny. Mezi další patří například kyselina

gentisová, vanillová, salicylová, 3,4-dihydroxybenzoová a 4-hydroxybenzoová (obrázek 1). Dimerní produkt kondenzace kyseliny hydroxybenzoové a její související dilakton je kyselina ellagová, která se běžně vyskytuje v rostlinách a vzrůstá o ní zájem díky jejím antikarcinogenním a antioxidačním účinkům [17,18].

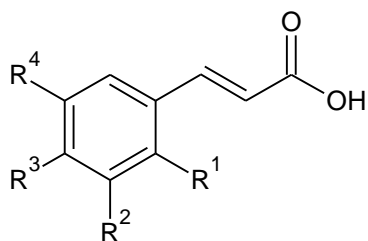


Kyselina	R¹	R²	R³	R⁴
Galová	H	OH	OH	OH
Gentisová	OH	H	OH	H
4-hydroxybenzoová	H	H	OH	H
3,4-hydroxybenzoová	H	OH	OH	H
Salicylová	OH	H	H	H
Syringová	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Vanillová	H	OCH ₃	OH	H
Veratrová	H	OCH ₃	OCH ₃	H

Obrázek 1: Struktura kyselin odvozených od benzoové.

Hydroxyskořicové kyseliny

Hydroxyskořicové kyseliny mají obecnou strukturu uvedenou na obrázku 2 a běžně se vyskytují v potravinách rostlinného původu. Hlavními zástupci této skupiny jsou kyselina, p-kumarová, kávová, ferulová a sinapová (obrázek 2). Výskyt těchto látek zaznamenáváme nejčastěji v ovoci. Hydroxyskořicové kyseliny jsou přítomny převážně ve vázané formě. Je pro ně obvyklý výskyt v různých konjugacích. Tyto konjugované formy jsou estery hydroxykyselin, jako je kyselina chinová, shikimová, vinná a jejich cukerné deriváty. Volné hydroxyskořicové kyseliny mohou být uvolněny pomocí chemické nebo enzymatické hydrolýzy během extrakce [17,19].

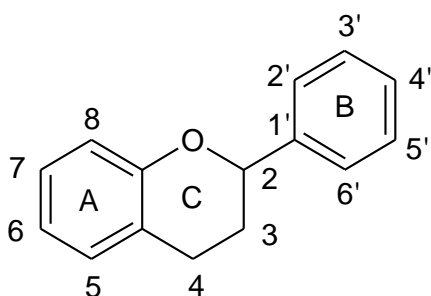


Kyselina	R¹	R²	R³	R⁴
Ferulová	H	OCH ₃	OH	H
Kávová	H	OH	OH	H
o-kumarová	OH	H	H	H
m-kumarová	H	OH	H	H
p-kumarová	OH	H	OH	H
Sinapová	H	OCH ₃	OH	OCH ₃

Obrázek 2: Struktura kyselin odvozených od skořicové.

1.1.1.3 Flavonoidy

Flavonoidy jsou nejběžnějšími a nejrozšířenějšími představiteli rostlinných fenolů. Jejich společná struktura, která je uvedena na obrázku 3 se skládá ze dvou aromatických kruhů (kruh A a kruh B) spojených prostřednictvím tří uhlíkových můstků a kyslíkového heterocyklu (C kruh). Název je odvozen od latinského slova *flavus*, což znamená žlutý, protože flavonoidy poskytují rostlinám barevné zbarvení. Mezi hlavní zástupce třídy flavonoidů patří antokyanidiny, chalkony, flavanoly, flavanony, flavony, flavonoly a isoflavony. Variabilita flavonoidů je založena na hydroxylaci pyronového kruhu, přítomnosti nebo nepřítomnosti dvojně vazby, počtu hydroxylových skupin v kruhu A a kruhu B, a nebo atomem kyslíku navázaným dvojnou vazbou k poloze 4 v kruhu C. Flavonoidy mohou být monomerní, dimerní nebo oligomerní. Polymerické flavonoidy, známé jako taniny, jsou rozděleny do dvou skupin: kondenzované a hydrolyzovatelné. Kondenzované taniny jsou polymery flavonoidů, zatímco hydrolyzovatelné taniny obsahují kyselinu galovou.



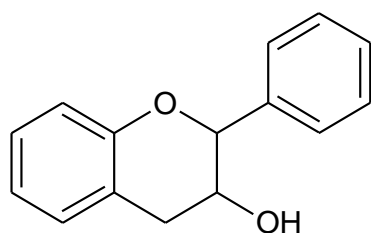
Obrázek 3: Základní struktura flavanoidu.

Flavonoidy jsou považovány za užitečné potencionální markery pro medy botanického původu a mají značný význam vzhledem k jejich potencionálnímu terapeutickému použití v alternativní medicíně. Přítomnost konkrétních fenolických látek a flavonoidů v medu dokáže ovlivnit jeho barvu, chuť a vůni. Tyto sloučeniny mají příznivé zdravotní účinky na lidský organismus [20,21].

Flavanoly a flavonoly

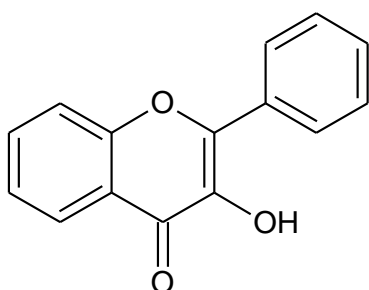
Flavanoly (katechiny) jsou známé také jako flavan-3-oly (obrázek 4) a patří mezi podskupinu proantokyanidinů, které mají hydroxylovou skupinu připojenou na uhlíkovém kruhu v poloze 3, žádný kladný náboj na atomu kyslíku a žádnou dvojnou vazbu v kruhu C. Struktury flavonolů (obrázek 4) jsou velmi podobné flavanolům (obrázek 5). Kromě toho,

že je atom kyslíku dvojitě vázaný a připojený v poloze 4 na kruhu C, tak je i samotná dvojná vazba v kruhu C. Flavanoly mají antioxidační účinky a běžným zástupcem flavanolů je rutin.



Pozice 5, 7, 3', 4': OH → Katechin
 Pozice 5, 7, 3', 4', 5': OH → Epikatechin

Obrázek 4: Základní struktura flavanolu.

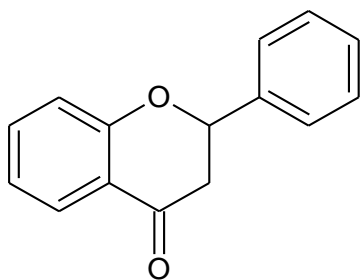


Pozice 5, 7, 4': OH → Kaempferol
 Pozice 5, 7, 3', 4': OH → Kvercetin

Obrázek 5: Základní struktura flavonolu.

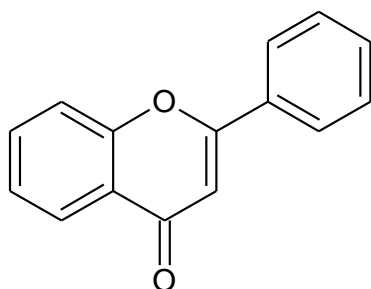
Flavanony a flavony

Flavanony (obrázek 6) a flavony (obrázek 7) mají struktury podobné flavanolům respektive flavonolům, ale liší se tím, že hydroxylová skupina již není připojena v poloze 3 na uhlíkovém kruhu. Flavanony se vytváří z chalconu, který se vytváří pomocí kyseliny p-kumarové. Mezi jejich hlavní zástupce patří hesperetin a naringenin. Flavony mají funkci přírodního inhibitoru, který brání před vlivem škodlivých oxidačních změn potravin. Známý zástupce flavonů je chrysin [21].



Pozice 5, 7, 4': OH → Naringenin
 Pozice 5, 7, 3', 4': OH → Eriodiktyol

Obrázek 6: Základní struktura flavanonu.

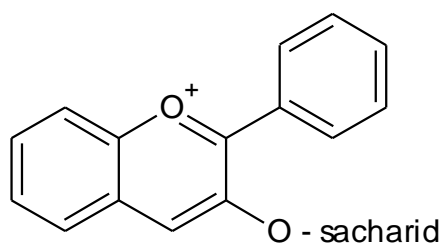


Pozice 5, 7, 4': OH → Apigenin
 Pozice 5, 7, 3', 4': OH → Luteolin

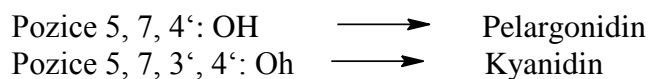
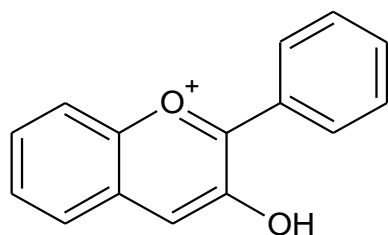
Obrázek 7: Základní struktura flavonu.

Antokyaniny a antokyanidiny

Antokyaniny, jejichž struktura je znázorněná na obrázku 8, patří mezi jednu z hlavních tříd flavanoidů. Významně přispívají k antioxidačním činnostem flavanoidů. Antokyaniny jsou rozpustné ve vodě a jejich pigmenty nesou odpovědnost za červená, modrá a fialová zbarvení. Antokyaniny jsou glykosylované antokyanidiny s cukernou složkou připojenou hlavně k 3-hydroxyly antokyanidinů. V některých případech se cukerné zbytky acylují kyselinou 4-hydroxybenzoovou, p-kumarovou, kávovou, ferulovou, sinapovou, octovou, šťavelovou, jablečnou, nebo jantarovou. Antokyanidiny, jejichž struktura je znázorněna na obrázku 9, patří mezi aglykony, neobsahují cukernou složku připojenou flavanovému jádru. Atom kyslíku na uhlíkovém kruhu má kladný náboj a dvě dvojně vazby v kruhu C [22].



Obrázek 8: Základní struktura antokyaninu.



Obrázek 9: Základní struktura antokyanidinu.

1.2 Med

1.2.1 Historie

Historie medu sahá až k obyvatelům Egypta a Řecka, kteří přidávali med a propolis do obvazů nebo jej užívali jako lék například na žaludeční vředy nebo kožní rány [23,24]. V novodobé historii byl používán během první světové války jako regenerace ran při zranění v boji. Antimikrobiální vlastnosti medu poprvé zaznamenal v roce 1892 Van Ketel. První zmínka o významné roli medu v hojení infikovaných ran, byla v Evropě a USA v polovině 20. století [25,26]. I přes prokázané antibiotické vlastnosti medu je jeho uplatnění v medicíně dosud poměrně nízké. Příchodem antibiotikům rezistentních bakterií a silné aktivitě medu proti těmto bakteriím se obnovil zájem o med v medicínálních aplikacích [26]. V mnoha studiích bylo prokázáno, že med má několik léčivých vlastností. Například med slouží jako antimikrobiální činidlo, podporuje hojení při autolytickém odstraňování mrtvých a poškozených tkání, stimuluje, urychluje hojící procesy a má protizánětlivý účinek, který rychleji snižuje bolest a otoky [27-29].

1.2.2 Terapeutické vlastnosti medu

Med díky svým antimikrobiálním, protizánětlivým vlastnostem a antioxidační aktivitě zesiluje účinky na imunitní systém. Významně přispívá při procesech hojení ran.

1.2.2.1 Antimikrobiální a antibakteriální aktivita

Pokud není imunitní systém schopen vypořádat se s infekcí v těle, podstupujeme antimikrobiální terapii [30]. Obvaz s nanočásticemi stříbra se používá kvůli jeho antibakteriální vlastnosti zejména na infekci při popáleninách, nicméně komponenty jako jsou stříbrné částice sulfadiazinu, mohou hojení ran zpozdit [31]. Předpokládá se, že med může být použit jako vhodná alternativní možnost léčby infikované rány [32,33]. Nicméně nesmí být zapomenuto, že včely mohou vytvářet různé typy medů. [24,34]. Kompoziční rozdíly medů mohou ovlivnit jejich léčivou hodnotu.

Zájem o med stoupá i kvůli jeho účinkům na antibiotikům rezistentní organismy. Špatné použití antibiotik a jejich rezistence k některým kmenům, má značný vliv na úmrtnost pacienta [34-36]. Antibakteriální vlastnosti medu souvisí s hladinou peroxidu vodíku a dalšími neperoxidovými faktory, jako je množství fenolových kyselin, flavonoidů a lysozymu v medu. Med má díky těmto faktorům jedinečné funkce: rychlé odstranění infekcí, čištění ran, redukce zjizvení na minimum, potlačení zánětu, stimulace angiogeneze a růst epitelu. Dnes vzrůstá zájem o apiterapii, jakožto lidovou a preventivní medicínu, která by měla napomáhat při léčbě určitých typů nemocí, případně se také užívá na podporu zdraví organismu a pohody. Jeho účinků se využívá zejména při gastrointestinálních poruchách, při hojení ran a popálenin a poskytuje ochranu žaludeční stěny proti akutním i chronickým lézím. Med je, díky své barvě, chuti a sladkosti, často užíván nejen jako náhražka cukru, ale u mnoha vyráběných potravin bývá využit i jako přírodní konzervační činidlo, což znamená, že brání před oxidačními reakcemi v potravinách, např. před oxidací lipidů v mase, při enzymatickém hnědnutí ovoce a zeleniny a zpomaluje proces žluknutí nebo změny barvy v důsledku oxidace světlem, teplem a některými kovy [37-39]. Bakteriální buněčné stěny u medu hrají zásadní roli v udržování tvaru buněk a udržení růstu bakterií. Inhibicí syntézy buněčné stěny, je med schopen indukovat strukturální změny v bakteriální buněčné stěně. Vzhledem k lýze buňky může být med považován jako vhodná látka s antibakteriální aktivitou [40]. Další složky medu, jako je glukóza, fruktóza a široká škála fytochemikálií, mají významnou roli při potlačení tvorby biofilmu u bakterií [41]. Kromě antimikrobiální aktivity byla potvrzena i antifungální aktivita medu. Med nejen inhibuje růst plísní, ale také snižuje produkci mykotoxinů [42-44].

Mechanismy antimikrobiální aktivity medu

Mechanismy antimikrobiální aktivity medu jsou klasifikovány do přímých a nepřímých skupin. Přímá akce je založena na přímém odstranění bakterií pomocí komponent v medu a nepřímá akce je antibakteriální reakce celého organismu vůči bakteriím. Faktory, které mají přímý vliv na bakterie a jsou toxické pro patogeny, zahrnují peroxid vodíku, faktory vysoké osmolality, kyselosti, neperoxidové faktory a fenoly. Nepřímé antimikrobiální akce zahrnují lymfocyty a produkci protilátek, cytokinů, imunomodulaci a produkci oxidu dusnatého.

1.2.2.2 Peroxid vodíku

Peroxid vodíku (H_2O_2) se běžně používá k dezinfekci a dezinfikování lékařského vybavení v nemocnici. Reaguje s myeloperoxidázou v blízkosti bakterie s fagocytující vakuolou [24,30]. Peroxid vodíku je jednou ze složek medu, který má důležitou úlohu v antimikrobiální aktivitě a pomalu se uvolňuje z medu v důsledku interakce exsudátu v ráně, což je zánětlivý výpotek, který se tvoří v tělesných dutinách s glukózooxidázou medu [26,45,46]. Glukózooxidáza se dostává do medu z nektaru pomocí včel a je schopna přeměnit za aerobních podmínek glukózu na peroxid vodíku a kyselinu glukonovou [26,32,47]. Z důvodu většího výskytu peroxidu vodíku jsou méně koncentrované medy vhodnější při hojení ran, než ty více koncentrované [48]. Ještě důležitější je fakt, že je med po naředění schopen odstranit patogeny rezistentní vůči antibiotikům [49,50]. V průběhu zrání medu je glukózooxidáza inaktivovaná, ale při ředění medu znovu získává svou aktivitu, což může být důsledkem nízkého pH [48]. Kyselina benzoová, jedna ze sloučenin vyskytující se v medu, může reagovat s peroxidem vodíku a vytvářet peroxokyseliny, které jsou více stabilní a silnější antimikrobiální činidla než peroxid vodíku [30]. Přítomnost kyseliny askorbové v medu může podporovat baktericidní aktivitu peroxidu vodíku. V gramnegativních bakteriích směs peroxidu vodíku a kyseliny askorbové zvyšuje lýzu buňky a smrt organismu pomocí lysozymů [24]. Při akutní zánětlivé fázi, kdy neutrofilní granulocyty uvolňují baktericidní reaktivní kyslík, je H_2O_2 schopný zabít bakterie a zabránit infekci [24,45].

Peroxid vodíku není obecně příznivý pro hojení ran, protože způsobuje nadměrný zánět a poškození tkáně. Nicméně med deaktivuje volné železo, které katalyzuje tvorbu volných kyslíkových radikálů produkovaných peroxidem vodíku a snižuje škodlivé účinky peroxidu vodíku. Navíc hladina peroxidu vodíku v medu je nízká, jeho koncentrace je asi $1000 \times$ menší než v 3 % roztoku peroxidu vodíku, který se běžně používá jako antiseptikum [51]. Je zajímavé, že i přes vysokou hladinu antioxidantů, může med chránit tkáně v ráně

prostřednictvím kyslíkových radikálů produkovaných H_2O_2 [30]. Kromě antimikrobiální aktivity, stimuluje peroxid vodíku proliferaci fibroblastů a angiogenezi [52,53].

1.2.2.3 Osmolarita

Vysoká osmolarita je považována za cenný faktor, který omezuje množení bakterií a proliferaci [24,30,46,54-56]. Mezi roztoky s vysokou osmolaritou patří med a glukóza [57]. Med jako viskózní tekutina poskytuje ochrannou bariéru a zabraňuje přenosu infekce v ráně [58]. Když je med topicky aplikován, což je aplikace přímo na postižené místo pokožky, tak vzhledem k jeho vysoké osmolaritě nemají bakterie dostatečný přístup k vodě potřebné pro jejich růst [57,54,59]. V důsledku toho může dojít k dehydrataci mikroorganismů a následně i k jejich úhynu [50,59]. Za vysokou osmolaritu medu je zodpovědné vysoké množství sacharidů [30]. I když je osmolarita medu důležitým antimikrobiálním faktorem, není antimikrobiální aktivita medu zcela potlačena, když je med ředěn [32]. Ve studii provedené u pacientů s otevřenou nebo infikovanou ránou, byl při snižování bakteriální kontaminace a hojení ran med účinnější než cukr.

1.2.2.4 Kyselost

Rozsah pH medu se pohybuje v rozmezí od 3,2 do 4,5. Tato nízká hodnota pH je důsledek tvorby kyseliny glukonové [46,55]. Glukózooxidáza při ředění medu katalyzuje rozklad glukózy na kyselinu glukonovou a peroxid vodíku, kde příčinou kyselosti je kyselina glukonová [28,60]. Med poskytuje kyselé prostředí, které je nepříznivé pro růst bakterií a inhibuje aktivitu mnoha mikroorganismů [30,33,46,47,55,56,60,61]. Ve většině případů patogenní bakterie upřednostňují pro svůj růst neutrální nebo mírně zásadité prostředí [60], ve kterém jsou optimální podmínky pro vysokou aktivitu jejich proteolytických enzymů (optimální pH pro aktivitu proteázy je kolem 7,3) [28]. Zvýšená aktivita proteázy může zničit růstové faktory, nově regenerované kolagenové matrice a fibronektin u ran, které jsou nezbytné pro aktivitu fibroblastů a reepitelizaci, což vede k dodatečným zánětlivým reakcím [33]. Kyselost medu ovlivňuje snížení proteázové aktivity, zvýšení aktivity fibroblastů, uvolňování kyslíku z hemoglobinu v kapilárách, snížení velikosti rány a v konečném důsledku podporuje i hojení ran [28,33,51,53,62]. Acidifikace také napomáhá při antibakteriálním působení makrofágů a zabraňuje amoniaku, produkovanému bakteriálním metabolismem, poškodit tělesné tkáně [66,67].

1.2.2.5 Antioxidační aktivita

Antioxidační aktivita medu je důsledkem přítomnosti polyfenolů, zejména v podobě fenolických kyselin (chlorogenové, ferulové, kávové, ellagové, vanilové, kyselině benzoové, kyselině skořicové, kyselině kumarové atd.) a flavonoidů (pinocembrin, apigenin, hesperetin, chrysin, kvercetin, luteolin, myricetin, pinobanksin, galangin, kaempferol atd) [68]. U těchto polyfenolů je známo, že mají zdraví prospěšné vlastnosti, jako je antiaterogenita (působící proti vzniku aterosklerózy), antikarcinogenita, antitromboticita a protizánětlivost. Rozptyl v antioxidačních vlastnostech mezi medy pocházejícími z různých zdrojů je způsoben rozdílem v zastoupení jednotlivých polyfenolů. Barva medu se pohybuje od světle žluté až po tmavě červenohnědou na tmavě hnědou. Odstín je závislý na teplotě a době skladování. Medy s tmavou barvou mají vyšší obsah fenolických látek a v důsledku toho i vyšší antioxidační aktivitu ve srovnání s medy světlé barvy [69-71]. Med může zabránit zhoršujícím se oxidačním reakcím v potravinách, jako je například oxidace lipidů v mase či enzymatickému hnědnutí ovoce a zeleniny [72,73]. Med má proto velký potenciál sloužit jako přírodní antioxidant v potravinách. Bylo prokázáno pomocí metody založené na zhášení kyslíkových radikálů (ORAC), že antioxidační kapacita medu je obdobná jako u mnoha druhů ovoce a čerstvé zeleniny. Antioxidační aktivita medu se mění v závislosti na zdroji rostlin či stromů, ze kterých med pochází. Rozdíly v těchto zdrojích mohou ovlivnit rozdílné schopnosti medů v ochraně proti oxidačním reakcím [74,75].

1.2.2.6 Zvýšená lymfocytární a fagocytární aktivita

Imunitní systém je stimulován k imunizaci těla proti různým infekcím a využití medu může mít více než jen antibakteriální vlastnosti. Med je schopen stimulovat B-lymfocyty a T-lymfocyty a aktivovat fagocytózu pomocí neutrofilů [33,55,76,77]. Med také stimuluje monocyty (MM6 buňky) k sekreci cytokinů, tumor nekrotizující faktor-a (TNF-a), interleukin-1 (IL-1) a IL-6, které aktivují imunitní reakci na infekci [47,63,76,78,79]. Sekrece TNF-a, cytokinu, který indukuje proces hojení rány, mohou být vyvolány glykosylovanými proteiny. Snižováním uvolňování reaktivních meziproduktů, které jsou aktivovány makrofágy během hojení ran, je med schopný degradovat kolagen IV prostřednictvím stimulace matrixové metaloproteinázy 9 (MMP-9) v průběhu reepitelizace procesu hojení rány [80,81]. In vitro studie ukázaly, že toxicita medu na keratinocyty a fibroblasty je extrémně nízká. Předpokládá se, že takový imunomodulační účinek dále zvyšuje antimikrobiální aktivitu medu [25].

1.2.2.7 Oxid dusnatý a jeho metabolity v medu

Oxid dusnatý (NO) je plyn radikálového charakteru (má ve své molekule nespárovaný elektron), který má vliv např. na regulaci angiogeneze, urychlení syntézy kolagenu, reepitelizaci při hojení ran [29,82-85].

Zahřívání a dlouhodobé skladování medu může snížit jeho obsah metabolitů oxidu dusnatého, což vede ke snížení antimikrobiální aktivity medu [54,86]. Bylo testováno sedm druhů medu, které se lišily svým původem (tři z Jemenu, dva ze Spojených arabských emirátů, jeden z Německa a jeden z Indie), barvou a dobou uchovávání na přítomnost dusitanů, dusičnanů a stabilních metabolitů oxidu dusnatého. Všechny vzorky medu měly různé koncentrace NO metabolitů, ale tmavší a čerstvé medy obsahovaly více metabolitů oxidu dusnatého, než světlejší nebo déle uchovávané medy. Tmavší medy, které byly skladované delší dobu, byly odolnější při zahřívání a vystavení ultrafialovému záření [87].

1.2.2.8 Prostaglandiny

Prostaglandiny jsou mediátory zánětu a bolesti, které mohou snížit funkce B- a T-lymfocytů. Jsou považované za imunopresiva, což jsou látky potlačující funkci imunitního systému [54,83]. Med může snižovat koncentraci prostaglandinu v plazmě a jeho inhibiční efekt se zvyšuje s časem [24,54]. Med indukce snížení koncentrace prostaglandinů a může snížit otoky, záněty a aktivaci lymfocytů k produkci protilátek proti patogenům v ráně [83]. Fenolické sloučeniny medu mají významnou úlohu v inhibici prostaglandinu E2 (PGE2), který se vyskytuje v tkáních zánětu. Kyselina ellagová jako hlavní fenolická sloučenina v medu, brání uvolňování PGE2 z monocytů a jiných fenolických sloučenin jako jsou kvercetin, chrysin a luteolin, jež mají inhibiční účinky na interleukin 1b a expresi COX-2, syntézu PGE2 a stimulaci nukleárního faktoru kappa-beta (NF- κ B) [83,88]. Bylo prokázáno, že užívání zředěného přírodního medu u běžných spotřebitelů, může snížit koncentraci prostaglandinu PGE2, včetně prostaglandinu F2a (PGF2a) a tromboxanu B2 v plazmě [29,89,90].

1.2.2.9 Tvorba protilátek

Med zvyšuje produkci protilátek, v průběhu primární a sekundární imunitní odpovědi, vůči antigenům závislým a nezávislým na thymu [55]. Má i vliv na produkci protilátek pomocí různých mechanismů. Nicméně přesný mechanismus nebyl dosud definován [54].

Med je schopen stimulovat lymfocyty k produkci cytokinů, TNF-a, IL-1 a IL-16 a může ovlivňovat imunitu zvýšením NO [91].

1.2.3 Složení medu

Med je přírodní přesycený roztok cukru, jenž se skládá hlavně z fruktózy a glukózy, které spolu tvoří 65-80 % celkových cukrů v medu [92] a také obsahuje některé důležité minoritní složky, jako jsou enzymy (amyláza a invertázy), organické kyseliny (kyselina glukonová, kyselina octová atd.), vitamíny, těkavé sloučeniny, fenolové sloučeniny a minerální látky [93]. Med je hodnotná potravina přírodního charakteru, která je vytvořena společenstvím včel ze sesbíraných sladkých šťáv rostlin-nektaru, nebo medovice na živých částech rostlin (stromů), kterou včely přetvářejí, kombinují a obohacují svými specifickými látkami, ukládají a nechávají zrát v plástech. Propolis vzniká z rostlinných pryskyřic, obohacených o slinné enzymatické sekrety a obsahuje polyfenoly, éterické oleje, aromatické kyseliny a vosky. Další méně běžný produkt včel je mateří kašička. Tato látka je vylučována z hypofaryngeálních a mandibulárních žláz včelích dělnic jako výživa pro královnu a larvy. Mateří kašička je bohatá především na sacharidy, lipidy, vitamíny a proteiny [94].

Med se skládá ze 17 % vody a 82 % sacharidů. Má nízký obsah tuku, vlákniny a bílkovin [92,95]. Jeho glykemický index se pohybuje v rozmezí od 31 do 78, v závislosti na typu medu [96]. Konkrétní složení, barva, aroma a chuť každé složky medu závisí na rostlinách, které byly pro daný med opylovány včelami [23]. Hustota medu se pohybuje okolo 1,36 kg/dm³ (o 36 % hustší než voda) [97].

Tabulka 2: Složení medu [98].

Složka	Obsah
fruktóza	28-41 %
glukóza	22-35 %
ostatní cukry (sacharóza, maltóza)	1-14 %
voda	17 %
ostatní látky (pyly, proteiny, vitamíny, AMK)	méně než 5 %

1.2.4 Klasifikace medu

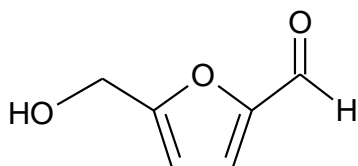
Med se dělí na dva základní typy, květový a medovicový. Květový med pochází z nektaru rostlin a medovicový ze sekretů živých částí rostlin nebo z výměšků hmyzu, který sají nektar z rostlin. U medovicového medu jsou antioxidační a antibakteriální vlastnosti vyšší než u medu květového. Medovicový med je také charakterizován vyššími hodnotami elektrické vodivosti, pH, acidity, tmavší barvou, vyšším obsahem oligosacharidů

a nižším obsahem monosacharidů než med květový. Tmavší zbarvení u medovicového medu je zapříčiněno rostlinnými barvivy, obsaženými v míze dřevin. Velmi významnými vlastnostmi medu jsou chuť a aroma. Chuť medovicového medu je výraznější než u květového, ovšem medovicový med není zdaleka tak sladký jako med květový. Hlavní disacharidy v květovém medu jsou sacharóza, maltóza, trehalóza a turanóza, kdežto medovicové medy obsahují více oligosacharidů, hlavně trisacharidy, melezitózu a rafinózu, které v květovém medu chybí. Květový med obsahuje také větší množství jednoduchých cukrů, jako je glukóza a fruktóza, které zapříčiňují jeho snadnou krystalizaci a lepší stravitelnost. Medy se mohou také dělit na míchané, polyflorální a monoflorální. Míchaný med je směs dvou nebo více medů, které se liší květinovým zdrojem, barvou, chutí, hustotou nebo geografickým původem. Polyflorální med pochází z nektaru více druhů květin a monoflorální pouze z jednoho druhu [99,100].

1.2.5 Výroba medu

Med, pocházející od včelaře, ve většině případů nebývá nijak výrazně tepelně upravován. V případě krystalizace medu během uskladnění, může být med lehce zahříván. Je však nutné dodržet teplotu max 50 °C, z důvodu zachování všech zdraví prospěšných látek. Tepelné zpracování medu má značný negativní vliv na obsah různých složek medu, jako jsou enzymy, těkavé sloučeniny a cukry.

Mezi parametry, které nám poskytují nejvíce informací, patří při vyhodnocování kvality medu obsah 5-hydroxymethylfurfuralu (HMF) a obsah fenolických látek v medovině. HMF (obrázek 10) je cyklický aldehyd, který je vytvořený degradací cukrů, což má za následek snížení nutriční hodnoty výrobku. Je to sloučenina, vznikající jako výsledek dehydratace hexos v kyselém prostředí, jejíž vznik souvisí s tepelnou úpravou medu nebo medového zákvasu. Působí také jako indikátor přehřátí a skladování ve špatných podmínkách [101-103].



Obrázek 10: Základní struktura HMF.

Použití HMF jako indexu kvality je založeno na skutečnosti, že jako sloučenina není přítomen v čerstvém medu a jeho konečná koncentrace v medu je pouze důsledek skladování nebo zahřívání. To je důležité zejména pro vícekvěťé medy, jelikož mají ve srovnání s těmi jednokvětými velmi odlišné chemické složení. Přítomnost HMF přímo ovlivňuje barvu, chuť a vůni, proto se také používá jako kritický parametr kvality medu. Koncentrace HMF v medu by neměla překročit 40 mg/kg a u tropického medu 80 mg/kg. Vyšší koncentrace HMF v medu indikují jeho přehřátí, špatné skladovací podmínky, dlouhodobé skladování, nebo že je med staršího původu.

Med není na trh dodáván ve svém surovém stavu. Obvykle proběhne proces industrializace z důvodu požadavků spotřebitelů na tekutý, nevykrystalizovaný produkt. Důležitými faktory pro krystalizaci jsou teplota, původ (geografický a botanický), obsah vody a cukrů. Průmyslová výroba medu má dvě fáze, které se týkají tepelné úpravy. První fáze je zkapalnění (cca 55 °C), pro zajištění nižší viskozity a tím i lepší manipulaci s produktem. Druhá fáze je pasterizace (cca 80 °C), jež se provádí z důvodu destrukce kvasinek, které by mohly zapříčinit nežádoucí fermentaci během skladování výrobku, z důvodu rozpuštění krystalizačních jader, které jsou příčinou tuhnutí medu (tím se zajistí, že med zůstane ve své tekuté formě, co možná nejdéle) [101-107].

1.3 Medoviny

Medovina je tradiční alkoholický nápoj, který obsahuje od 8 do 18% ethanolu (v/v). Navzdory tomu, že medovina je fermentovaná směs medu a vody, existuje mnoho jejích variací od tradičních až po složité směsi ovocných šťáv a koření [108-111]. Dle zahraniční literatury [111] se medoviny dělí na několik druhů. Nejběžnějším druhem je „metheglin“, což je sladká medovina obsahující koření nebo byliny. Vůně a chuť této medoviny je ovlivněna množstvím a druhem koření, které může potlačovat i chuť samotného medu. Další varianta medoviny je „melomela“, v níž se místo vody používá ovocná šťáva. Tento druh je výhodný především z hlediska výrobní ceny, jelikož ovocná šťáva je levnější než med. Melomela v níž se místo vody používá hroznový mošt, se nazývá „Pymment“. Medoviny lze také dělit na Hippocras - pymment s bylinkami a kořením a medovinu s vysokým obsahem medu, která je extrémně sladká [108-111].

Dále se mohou medoviny dělit podle způsobu přípravy na vařené a nevařené. Vařené vznikají vařením medu s vodou. Medový roztok se naplní do dvou třetin výšky nádoby a mírně se vaří. Při vaření se sbírá pěna, která obsahuje vyplavené nečistoty, tím se z roztoku

odstraní bílkoviny a nežádoucí zakalení. Délka procesu závisí na tom, kdy se pěna přestane tvořit. Nevařené medoviny se vyrábí smísením panenského medu, vody a kvasinek za chladu nebo za mírně zvýšených teplot, kdy nedochází k tepelné degradaci složek medu. Při tomto zpracování se používají medy vyšší kvality z hlediska chuti a vůně, u kterých si medovina zachová všechny jakostní parametry medu, které by se jinak při zvýšení teploty odstranily [112].

Tradiční výrobní proces zahrnuje zahřívání nebo var medového zákvasu (nezkvašený roztok medu a vody), za účelem odstranění proteinů a eliminaci mikroorganismů. Tento krok snižuje nebezpečí nekontrolovaného průběhu fermentace, ale může také způsobit degradaci termolabilních látek. Mezi tyto látky patří například některé fenolické kyseliny a flavonoidy pocházející z medu. Dalším negativním důsledkem těchto úprav je možné zvýšení obsahu 5-hydroxymethylfurfuralu, ke kterému dochází v případě tepelného zpracování [113].

Fermentace medu probíhá v porovnání s jiným alkoholovým kvašením delší dobu, často i několik měsíců. Doba fermentace závisí na druhu medu, respektive na jeho složení a použitém kvasinkovém kmeni. V průběhu kvašení se může vyskytnout několik problémů, a to zejména v důsledku neschopnosti kvasinek reagovat a přizpůsobit se nepříznivým stresovým růstovým podmínkám v medu. Komplikace, jako je nejednotnost finálního produktu, vzniká pravděpodobně kvůli variabilitě složení medu a výskytu opakovaných fermentací. Tyto fermentace, způsobené octovým nebo mléčným kvašením, mohou zvýšit obsah těkavých kyselin a podporovat produkci abnormálního množství esterů, jež ovlivňují sensorické vlastnosti konečného produktu [108,109,114].

I přesto, že je medovina jeden z nejstarších fermentovaných nápojů na světě, její výroba utrpěla v posledních letech pokles, a to částečně kvůli nedostatku vědeckých pokroků v této oblasti [108,109].

1.3.1 Historie výroby medoviny

Archeologické nálezy dokládají zmínky o výrobě medoviny již téměř před 3000 lety. Počátky tohoto nápoje lze objevit už v afrických zemích. Později byla medovina vyráběna v celé středomořské oblasti a Evropě, kde hrála důležitou roli v raných starověkých civilizacích. Medovina byla důležitou součástí rituálů Keltů, Anglosasů a Vikingů, kteří ji označovali za nápoj šlechticů a bohů, poskytující nesmrtelnost a moudrost. Věřili, že může mít magické a léčivé účinky, dokonce že může zvýšit sílu, mužnost a plodnost. První, kdo se zabýval podrobným popisem použití medu pro výrobu medoviny, byl Lucius Junius

Moderatus Columella a Plinius starší. Zájem o výrobu medoviny s časem klesl. Dnes se tradice výroby medoviny udržuje nejvíce v Polsku [108,111,115].

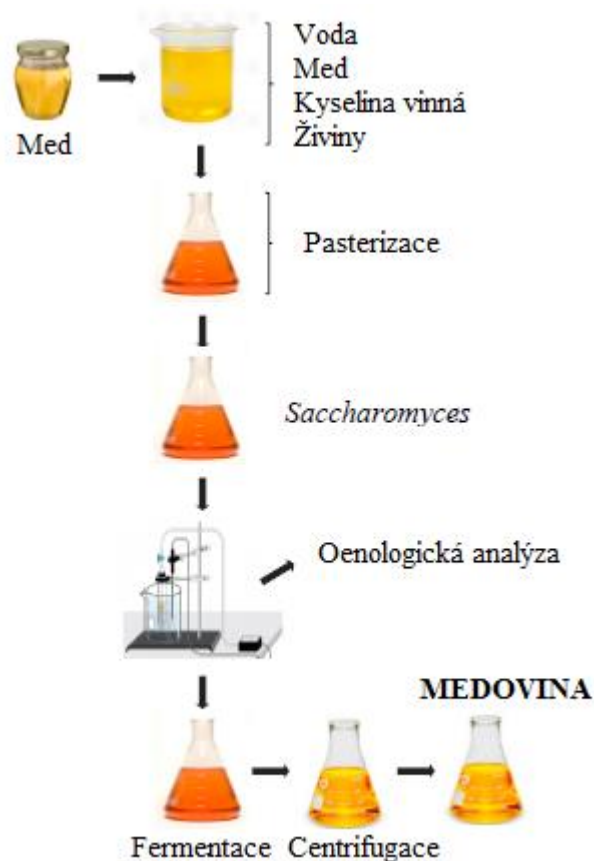
1.3.2 Kvasinky používané ve výrobě medovin

Kvasinky, které metabolizují cukry, jako je glukóza a fruktóza alkoholovým kvašením, mají podíl na tvorbě ethanolu a oxidu uhličitého. Výběr kmene kvasinek při výrobě hraje klíčovou roli, jelikož má vliv na účinnost přeměny cukru na alkohol. V prvních studiích týkajících se výběru kvasinek pro výrobu medoviny bylo navrženo, že vzhledem k nízké podobnosti mezi medem a vínem, pokud jde o cukry a koncentraci dusíkatých látek, není vhodný pro výrobu medovin kmen *Saccharomyces cerevisiae* [108,116,117].

Kvasinky izolované z medu neprokázaly výhody oproti snadno dostupným komerčním kmenům, a to navzdory identifikované odolnosti vůči etanolu, oxidům síry a vysoké koncentraci cukrů [109]. Vzhledem k výhodám komerčních kvasinek, jež plynou z jejich stability a snadnější dostupnosti pro výrobce medovin, se doporučuje očkování medového zákvasu komerčními kvasinkami, které se používají při výrobě bílých vín. Nejvhodnější kmen kvasinek je D47 ICV, jelikož vykazuje vysokou rychlost kvašení a nízkou produkci těkavých kyselin a acetaldehydu [110]. Acetaldehyd nepříznivě ovlivňuje chuť a je podezřelý z vyvolání dlouhodobého nepříznivého účinku na spotřebitele [118]. I přes použití startovacích kultur pro výrobu medovin několik problémů ve výrobě stále přetrvává, příčina by mohla být v důsledku použití kvasinkových kmenů, které nejsou vhodné pro konkrétní složení medu nebo v souvislosti se stresovými podmínkami, mezi něž patří vysoká hodnota osmolality, nízká koncentrace základních živin s nízkým obsahem minerálů, nízké pH a nízká pufrací kapacita. Z tohoto důvodu je nutné najít a izolovat kmene kvasinek se zvýšenou odolností a lepším výkonem kvašení v drsných podmínkách výroby medovin [108,109,114,118,119].

1.3.3 Základní kroky výroby medovin

Výroba medovin se skládá z několika základních kroků (viz obrázek 11). Obecně platí, že první stupeň zahrnuje přípravu medového zákvasu následovanou úpravou pH. V dalším kroku bývá zákvas většinou pasterován a naočkován kvasinkami a následně dojde postupně k fermentaci a dokvašování. Získaná medovina se odstředí kvůli odstranění nežádoucího materiálu [108,110].



Obrázek 11: Základní schéma moderní výroby medoviny [108].

1.3.3.1 Směs med-voda a aditiva

Příprava zákvasu spočívá v přípravě směsi vody a medu; i když se podíl vody může nahradit ovocnou šťávou v závislosti na typu medoviny, která má být vyrobena. Med je stěžejní surovinou pro výrobu medoviny. V důsledku toho výrazně ovlivňuje výrobu a vlastnosti medoviny [114]. Jeho kvalita je ovlivněna množstvím mikroorganismů, jejichž množství závisí na druhu medu a obsahu vody, protože nízký obsah vody inhibuje růst mikroorganismů [120]. Kromě toho má med bakteriostatickou nebo baktericidní aktivitu, nízké pH a vysoký obsah redukujících cukrů, může zabránit růstu mnoha mikroorganismů. Chemické složení tohoto přírodního produktu je komplex, zahrnující víc než 180 látek s hlavním podílem sacharidů (viz kap. 1.2.3) [108,121,122].

Obrázek 11 ukazuje, že se med nejdříve zředí vodou a následně se přidá směs živin. Stupeň ředění, na který je med ředěn, určuje typ medoviny, kterou potřebujeme vyrobit. Nejlepší je podíl 2:1 (med: voda), další možné varianty jsou 1:1, 1:2 a 1:3. Směsi, obsahující nejvyšší koncentrace cukru v medu (2:1 a 1:1 typ), se získávají postupným přidáváním medu, aby se zabránilo zástavě kvašení nadměrným osmotickým tlakem [119].

Před nebo po fermentaci mohou být přidány další přísady, jako jsou ovocná vláknina nebo šťávy, kyselina citrónová a pyl. Tyto přísady se používají zejména k urychlení kvašení, snížení ceny fermentace, zvýšení množství alkoholu a k ovlivnění charakteru konečných vlastností medoviny. Mezi další obvyklé přísady patří: síran amonný, fosforečnan draselný, chlorid hořečnatý, kyselina citrónová, citrát sodný, biotin, pyridoxin, myoinositol, pantotenát vápenatý, thiamin a pepton. Tabulka 3 ukazuje přísady, které byly nalezeny v medovinách, pocházejících z různých zemí [108,123].

Tabulka 3: Přidávky používané při výrobě medovin během přípravy zákvasu (podle [108]).

Země	Přísady	Délka fermentace (dny)
Indie	glukóza, kvasinkový extrakt, pepton, síran hořečnatý, dihydrogenfosforečnan draselný, síran zinečnatý	90
Portugalsko	hydrogenfosforečnan amonný, kyselina vinná, dihydrogenfosforečnan amonný, vinan sodno-draselný, síran hořečnatý, síran vápenatý, oxid siřičitý, bentonit sodný, vinan draselný, kyselina jablečná	5-14
Slovinsko	síran amonný, chlorid hořečnatý, dihydrogenfosforečnan draselný, kyselina citrónová, citran sodný, vitamín B ₇ , vitamín B ₆ , myoinositol, vitamín B ₅ , vitamín B ₁ , pepton	-
Slovensko	bez přísad	60-90
Polsko	hydrogenfosforečnan amonný, kyselina citrónová	25-30
USA	Med (38% fruktózy, 30% glukóza, 10% maltózy, a 2% sacharosy) zředěný vodou a ethanolem	28-42
Nigérie	oxid siřičitý	21
Španělsko	disiřičitan draselný, pyl	-

Další krok spočívá v přidavku pufru, což je důležité pro udržení pH, v rozmezí 3,7-4,0 během průběhu fermentace. Tuto funkci nejlépe splňují uhličitan vápenatý, uhličitan draselný, hydrogenuhličitan draselný a kyselina vinná. Někdy se může přidat i kyselina citrónová nebo kyselina mléčná. Dále se redukuje mikrobiální zátěž, která je přítomná v médiu, aby se zabránilo interferenci s fermentačním procesem. Pro dosažení nízkého zatížení nežádoucími mikroorganismy v konečném produktu, je medový zákvas před začátkem kvašením sterilizován varem. Bylo prokázáno, že tepelná úprava je schopna měnit antioxidační kapacitu produktu změnou svého fenolického profilu [108,123,124].

V dalších studiích jsou uvedeny i méně agresivní techniky pro snížení mikrobiální zátěže, včetně přidání disiřičitanu ve formě sodné, nebo draselné soli, kdy obě uvolňují oxid

siřičitý, který inhibuje nebo eliminuje většinu mikroorganismů. Také při použití oxidu siřičitého v plynném stavu během procesů pasterizace a ultrafiltrace se prokázalo snížení mikrobiální zátěže. Tyto metody mají i nevýhody, které jsou spojeny s odstraněním proteinů při denaturaci a koagulaci. Po pasterizaci se medový zákvas naočkuje předem zvolenými kvasinkami. Po naočkování kvasinkami se pravidelně odebírá aseptický vzorek a probíhá monitorování fermentace a růstových parametrů. Na konci se provede filtrace a centrifugace, aby se získal konečný produkt v podobě medoviny [108-110,114,123].

1.3.3.2 Proces fermentace a postfermentační úprava

Kvašení a zrání medoviny je časově náročný proces, který probíhá od několika týdnů do několika měsíců (až let), přičemž kvalita výsledného produktu je velmi variabilní. Fermentace roztoku medu se může stát obtížnou z důvodu vysoké koncentrace cukru ze sladiny a výsledného vysokého osmotického tlaku nebo z důvodu přítomnosti některých inhibičních látek. Ovšem v Africe a Jižní Americe se produkuje i tropický druh medu, který je velmi tekutý a rychle podléhá fermentaci. Průběh kvašení medovin závisí na několika faktorech, jako jsou optimální pH, míchání během procesu a dostatek základních živin (dostatek dostupného dusíku a odpovídající koncentrace minerálních živin [108-110,114,119,125].

Na konci kvašení je nutné provést úpravy podmínek zrání, a to navzdory nárůstu výrobních nákladů. Pro tyto účely je často používán bentonit a želatina [109,125].

1.3.4 Ovlivnění kvality při výrobě medovin

Pokud jde o hodnocení kvality medovin, vysoké koncentrace HMF a absence většiny běžných fenolických sloučenin, indikují nadměrné zahřívání medu během výroby. Také je velmi pravděpodobné, že některé fenolické sloučeniny mohou být použity jako indikátory složení a kvality medovin. Detekce abnormálně vysoké koncentrace některých látek jako je vanilin, nebo jejich přítomnosti v jiných případech, může svědčit o šizení kvality medu viz kap. 1.2.5 [114].

1.3.5 Problémy při výrobě medovin

V průběhu fermentačního procesu může dojít k několika problémům, přičemž nejčastější problém je neschopnost dosáhnout požadovaného obsahu alkoholu, pomalá fermentace a heterogenita konečného produktu. V některých případech, může vzniknout re-fermentace kvasinkami nebo bakteriální sekundární fermentace, což vede

k produkci kyseliny mléčné a kyseliny octové a tím ke zvýšení produkce těkavých esterů, vyvolávajících nežádoucí aroma. Mezi nejčastější sloučeniny, které způsobují nežádoucí vůni, patří ethylacetát, oktanová a hexanová kyselina. Kombinace těchto sloučenin mění sensorické vlastnosti medoviny, konkrétně aroma a chuť, takže se medovina stává nepoživatelnou. Kvasinky, které zůstanou na produktu po fermentaci v důsledku neúčinných technik filtrace, produkují nežádoucí aroma. Mezi sloučeniny způsobující tento zápach patří estery, kyseliny, fenoly a sirovodík (zápach zkažených vajec) [17,111,114,126].

Na proces výroby medovin má značný vliv druh medu a přidaná aditiva. Nejlepší med pro výrobu medovin je tmavý, jelikož je bohatší na minerály a má vyšší pH. Světlý med obsahuje méně minerálů, což způsobuje interference při fermentaci. Další významný faktor ovlivňující výrobu medovin je teplota. Nízká teplota kvašení přispívá k dosažení stálosti průběhu kvašení a lepší transformaci aromatických a chuťových vlastností konečného produktu. Při teplotě nad 25 °C a vyšší koncentrací cukrů (glukóza a fruktóza) a dalších živin je fermentace velmi rychlá. V závislosti na podmínkách fermentace a ředění medu se medovina obvykle fermentuje 2 až 3 měsíce. Pro *Saccharomyces cerevisiae* se vyšší rychlost kvašení získá při teplotách mezi 20 a 30 °C, zatímco teplota nižší než 15 °C snižuje fermentační výkon a v důsledku toho i prodlužuje dobu fermentace. Nižší teplota pomáhá udržovat stabilní průběh fermentace a zaručuje lepší přechod aromatických a vonných látek do finálního produktu. Je však důležité poznamenat, že se rychlost fermentace také snižuje, pokud je teplota vyšší než 30 °C [108,109,127,128].

1.4 Separační a detekční techniky využívané pro analýzu fenolických látek v medu a medovinách

1.4.1 Extrakce z kapaliny do kapaliny

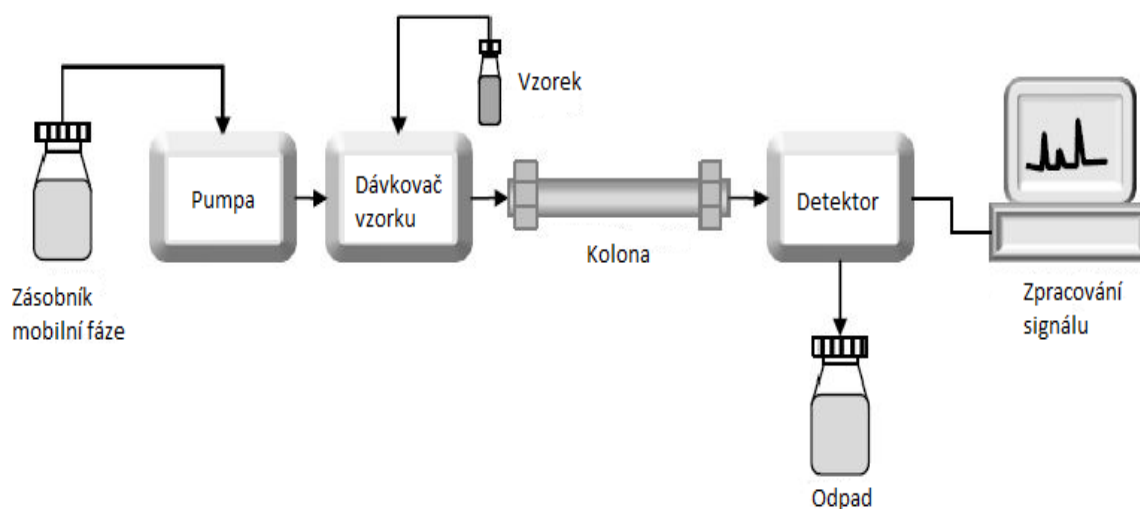
Patří mezi jednu z prvních separačních technik a je založená na principu rozdělování analytu mezi dvě nemísitelné nebo omezeně mísitelné kapalně fáze. I když se jedná o historicky velice starou separační techniku, stále má své široké uplatnění při úpravě vzorků, kdy slouží jako předseparační a koncentrační metoda. Podstatou této techniky jsou rozdílné fyzikálně-chemické vlastnosti extrahovaných látek, zejména velikost jejich rozdělovacího koeficientu. Výhody této techniky jsou jednoduchost, odstranění matricových efektů při HPLC/MS analýzách, nenáročnost na provedení a na složitost vybavení. Naopak mezi nevýhody patří tvorba emulzí, vysoká spotřeba organických rozpouštědel, nepoužitelnost pro polární látky, časová náročnost a nutnost odpaření rozpouštědla. [129].

1.4.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je jednou z nejrozšířenějších separačních a analytických metod, při které dochází ke vzniku rovnovážných stavů separovaných látek mezi stacionární fází a mobilní fází. Jako mobilní fáze se používá kapalina a stacionární fázi představuje sorbent, který je imobilizován v koloně. Tato metoda dosahuje vysoké účinnosti a rychlosti dělení látek a je vhodná pro analýzu organických méně těkavých látek, látek tepelně nestálých, nepolárních až iontových. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie má široké uplatnění v různých oborech například biochemie, analýza potravin, monitorování životního prostředí a analýzy léčiv. [130,131].

1.4.2.1 Instrumentace v HPLC

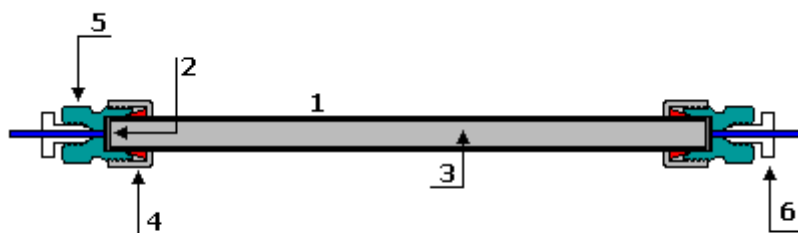
Základní technické vybavení HPLC se skládá ze zásobníku mobilní fáze, dávkovacího zařízení, vysokotlakého čerpadla, separační kolony se stacionární fází, detektoru a zařízení pro záznam a vyhodnocení naměřených dat (obrázek 12). Jako zásobník mobilní fáze se používají skleněné lahve. Jako mobilní fáze v HPLC se obvykle používají směsi polárních a nepolárních kapalin s různými aditivy. Dávkování vzorku může být manuální s využitím vícecestného ventilu s dávkovací smyčkou nebo automatické pomocí autosampleru. Po nadávkování je vzorek unášen mobilní fází na kolonu, kde dochází k separaci. HPLC čerpadla čerpají mobilní fázi do systému pod vysokým tlakem 30 – 60 MPa a musí být vyrobena z chemicky i mechanicky odolného materiálu (ocel, titan). Při čerpání mobilní fáze se klade důraz na přesnost a reprodukovatelnost průtoku v celém rozsahu pracovních tlaků. Na konci chromatografického systému je detektor, který detekuje separované látky vycházející z kolony a poskytuje elektrický signál jako odezvu, která je úměrná změně vlastností eluátu. Detektor by měl mít širokou linearitu odezvy, specifitu a dostatečnou citlivost pro daný analyt. [130,132].



Obrázek 12: Základní schéma HPLC systému [131].

Chromatografická kolona

Výsledek chromatografické separace je ovlivněn typem kolony a její náplní (sorbentem), proto má volba vhodné kolony se stacionární fází velký význam. Chromatografická kolona je rovná trubice nebo kapilára, která je rovnoměrně naplněná nebo pokrytá stacionární fází. Klasická HPLC kolona, která je znázorněna na obrázku 13, se skládá z kovového pláště (1), jehož hlavní cíl je udržet uvnitř stacionární fázi. Materiál kolony musí být chemicky inertní a odolný vůči vysokým tlakům (60 MPa i více). Vnitřní povrch pláště kolony by měl být dostatečně hladký a bývá uzavřen na koncích porézni kovovou fritou (2). Frita zabraňuje uvolňování stacionární fáze (3). Kolona je pomocí koncového šroubení (4,5) spojena se vstupem pro kapiláru se šroubem (6). [129,133]



Obrázek 13: Schéma chromatografické kolony [133].

1- plášť kolony, 2- vstupní (výstupní) frity, 3- stacionární fáze, 4, 5- koncové šroubení kolony, 6- kapilára se šroubem

Podle velikosti se dělí kolony na preparativní, semipreparativní, analytické kolony a mikrokolony. Pro analytické účely se dnes využívá analytických kolon o vnitřním průměru 2-4,6 mm a délce 10-300 mm. Chromatografické kolony se dodávají v současné době jako klasické kovové kolony s koncovkami nebo jako kolony typu „cartridge“, které se upevňují do univerzálních koncovek, k tomu dodávaných. Při skladování a transportu jsou plněné mobilní fází (tabulka 4) [129,133,134].

Tabulka 4: Typy kolon a jejich uchovávání [132].

Kolona	Mobilní fáze
Silica	hexan/acetonitril
C ₈ , C ₁₈	acetonitril/voda (methanol/voda)
NH ₂	dichlormethan/methanol
CN (normální fáze)	hexan
CN (reverzní fáze)	acetonitril/síran amonný (0,05 mol/l)
Fenyl	acetonitril/voda

Dle typu matrice se kolony dělí na plně porézní a povrchově porézní. Matrice slouží většinou k zakotvení vhodné stacionární fáze. Nejčastěji se jako matrice používá silikagel, oxid hlinitý nebo oxid titaničitý, ale mohou být použity i různé organické polymery. Na matici je chemicky navázána vlastní stacionární fáze, která ovlivňuje výsledné vlastnosti sorbentu. V současnosti je standardní velikost částic sorbentu 1,7 – 5 μm. Účinnost separace roste se snižováním průměru částic sorbentu v koloně, zároveň se však zvyšují nároky na jednotlivé části chromatografického systému (tlaková odolnost, malý dávkovaný objem, velikost detekční cely,...). Snaha urychlit přenos hmoty ve stacionární fázi, přispěla k rozvoji povrchově porézních materiálů. Povrchově porézní částice jsou tvořeny pevným silikagelovým jádrem (d = 1,7 μm) a tenkou vrstvou (0,5 – 0,6 μm) porézního silikagelu na povrchu, v jehož pórech dochází k difuzi analytu. Jelikož analyt nemusí difundovat tak hluboko, zkrátí se čas jeho pobytu v koloně a nastane zrychlení celé analýzy. Povrchově porézní vrstva odpovídá až 75 % celkového objemu částice [129,133,135,136].

1.4.2.1.1 Detektory v HPLC

Mezi základní technickou část vybavení chromatografu patří detektor, který detekuje látky eluující z kolony. Detektory dělíme na selektivní, které poskytují odezvu pro omezenou skupinu látek a univerzální, jejichž odezva není ovlivněna typem analyzovaných látek. Mezi nejpoužívanější detektory patří fotometrický (UV, VIS), detektor s diodovým polem (DAD), fluorimetrický, elektrochemický, vodivostní a hmotnostní spektrometr použitý jako detektor.

Fotometrické detektory jsou založené na principu toho, že většina organických látek absorbuje v oblasti ultrafialového záření (UV), některé i ve viditelné oblasti světla (VIS). Detektory tohoto typu mohou pracovat s fixní vlnovou délkou (velmi často 254 nm), s možností výběru několika vlnových délek (filtrové) nebo jsou opatřeny monochromátorem a fungují na principu spektrofotometru v rozsahu 190-800 nm. Modifikací tohoto typu detektoru je detektor s diodovým polem, který je schopen v jednom okamžiku zaznamenávat signál (spektrum) v celém vybraném rozsahu vlnových délek [129,130,135].

1.4.2.2 Fázové systémy v kapalinové chromatografii

Fázové systémy v kapalinové chromatografii dělíme podle relativní polarizace stacionární a mobilní fáze na systémy s normálními fázemi (NP), kde je stacionární fáze polárnější než fáze mobilní a na systémy s obrácenými fázemi (RP), kde má mobilní fáze větší polaritu než fáze stacionární [129].

Chromatografie v systémech s normálními fázemi

Chromatografie, v systémech s normálními fázemi (NP-HPLC), separuje látky na základě rozdílné síly interakce analyzovaného vzorku s polární stacionární fází. Jako stacionární fáze se používá anorganický polární adsorbent – silikagel (Al_2O_3 , ZrO_2 , TiO_2) nebo chemicky vázané stacionární fáze, které jsou středně až silně polární. U NP-HPLC dochází k separaci látek podle jejich polarizace, čím je látka více polární, tím se více zadržuje. Jako mobilní fáze se používá směs nepolárního (např. hexan, heptan) a polárního organického rozpouštědla (např. propanol, dichlormethan). Při použití polárnějších mobilních fází se snižuje retenční čas analytu. Velmi polární rozpouštědla (voda) silně interagují se stacionární fází a ta se deaktivuje a dochází ke zhoršení reprodukovatelnosti. Naopak použitím méně polární mobilní fáze se díky malé eluční síle rozpouštědla prodlouží retenční časy látek [129,130].

Chromatografie v systémech s obrácenými fázemi

Chromatografie v systémech s obrácenými fázemi (RP-HPLC) využívá k separaci disperzní interakce mezi analyzovaným vzorkem a stacionární fází. RP-HPLC je používána častěji než NP-HPLC. Lze ji využít pro menší molekuly i pro komplikovanější směsi. Stacionární fáze jsou nepolární, nejčastěji na bázi chemicky modifikovaného silikagelu. Mezi

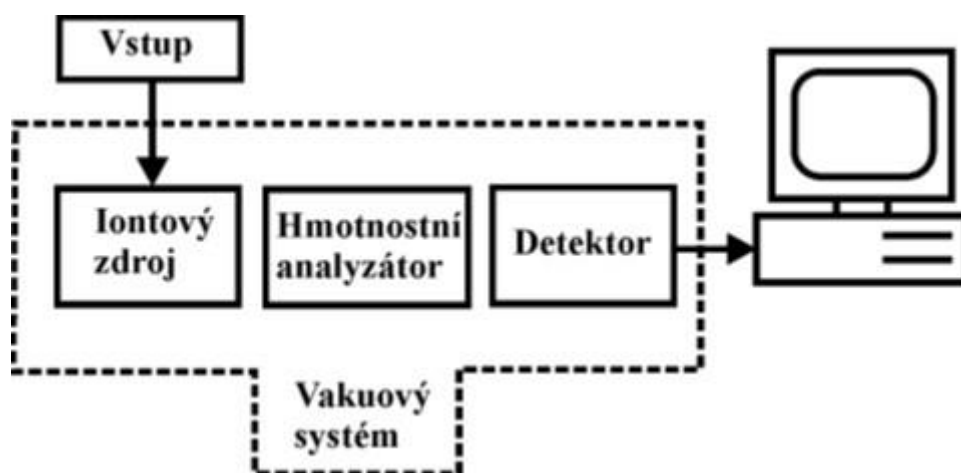
hlavní zástupce patří oktadecylové chemicky vázané stacionární fáze (C18), oktylové (C8) a další alkylové (C4, C30), hydrofobní polymery, pórovitý grafitický uhlík bez mikropórů, fenylalkylové a nitrilové stacionární fáze. Jako mobilní fáze se používá směs vody a polárních rozpouštědel (acetonitril, metanol, isopropanol). Může obsahovat i další vhodné modifikátory. Nepolární látky jsou v takovém systému déle zadržovány a mají delší retenční čas oproti polárnějším látkám. Systémy RP-HPLC jsou vhodné pro separaci látek odlišných velikostí hydrofobních částí molekul. Retence látek se snižuje s rostoucí koncentrací organické složky v mobilní fázi a s rostoucí polaritou stacionární fáze [129,130,137].

1.4.3 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je moderní instrumentální technika, která je schopna analyzovat organický i anorganický materiál. Slouží k převedení molekul na jednotlivé charakteristické ionty, k rozdělení těchto iontů podle poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z) a nakonec záznamu relativních intenzit jednotlivých iontů. Záznam hmotnostního spektra (relativních intenzit) je charakteristický pro danou látku a poskytuje informace o struktuře této látky. Výhody metody jsou vysoká citlivost, minimální spotřeba vzorku a možnost pracovat s čistými látkami i směsmi. Mezi nevýhody patří především destrukce vzorku a vysoké provozní i pořizovací náklady. Princip analýzy se zakládá na měření hmotnostních spekter [138,139].

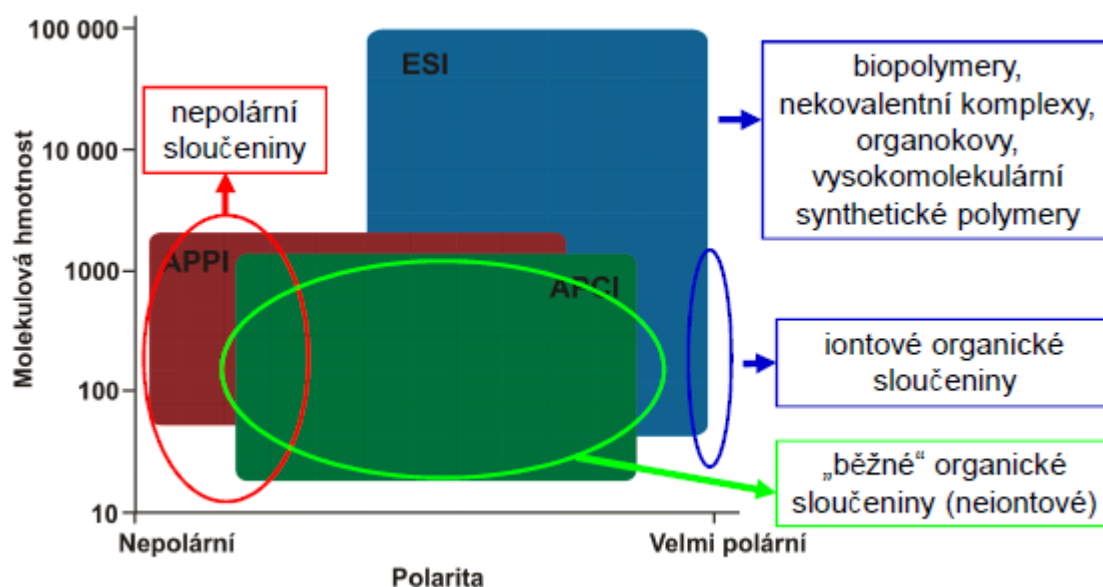
1.4.3.1 Základní instrumentace v hmotnostní spektrometrii

Hmotnostní spektrometr (obrázek 14) se skládá ze tří základních částí: iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru. Iontový zdroj převádí neutrální molekuly analytu na částice s nábojem (tzv. ionizace), konstrukce se liší podle použité ionizační techniky. Hmotnostní analyzátor slouží k separaci iontů v plynné fázi za vakua podle poměru jejich hmotnosti a náboje m/z . Dělení iontů v analyzátoru probíhá za vakua 10^{-3} - 10^{-11} Pa, vždy podle typu použitého analyzátoru. Detektor slouží k detekci iontů po jejich rozdělení podle poměru m/z a k určení relativní intenzity (četnosti) jednotlivých iontů. Zavádění vzorku může být přímé nebo spojené se separační technikou. Mezi další důležité části hmotnostního spektrometru patří vakuový systém, iontová optika sloužící k urychlení a fokusaci iontů a počítač na ovládání a ladění přístroje, sběr, ukládání a zpracování dat a porovnání spekter s databázemi spekter [139,140].



Obrázek 14: Základní schéma hmotnostního spektrometru [141].

Na základě množství dodané energie, která na molekulu při ionizaci působí, rozdělujeme ionizační techniky na měkké a tvrdé. Neexistuje univerzální ionizační technika pro všechny látky, proto je nutné vždy vybrat optimální způsob ionizace pro danou látku a účel. Výběr je závislý na vlastnostech ionizované látky. Způsob ionizace se volí podle polaritě látky, molekulové hmotnosti, těkavosti a tepelné stability (obrázek 15). U tvrdých ionizačních technik ionizovaná molekula při ionizaci získá nadbytek vnitřní energie, což se projeví fragmentací molekulového iontu na menší části (tzv. fragmentové ionty). Mezi tyto



Obrázek 15: Možnosti aplikace ionizačních technik, které pracují za atmosférického tlaku v závislosti na polaritě a molekulové hmotnosti ionizovaných látek [139].

techniky patří hlavně elektronová ionizace (EI). Měkké ionizační techniky jsou šetrnější a ionizovaná molekula získá mnohem menší množství energie oproti předchozí variantě, proto ve spektrech pozorujeme zejména protonované a deprotonované molekuly a minimum fragmentových iontů. Do této skupiny řadíme chemickou ionizaci (CI), ionizaci elektrosprejem (ESI), desorpční ionizaci elektrosprejem (DESI), fotoionizaci za atmosférického tlaku (APPI), ionizaci laserem za účasti matrice (MALDI) a chemickou ionizaci za atmosférického tlaku (APCI). Ionizační techniky se dále dělí na techniky, které pracují při tlaku sníženém (EI, CI a MALDI) a atmosférickém (ESI, APPI, APCI). Vhodnost jednotlivých ionizačních technik pro různé typy analyzovaných látek je znázorněna na obrázku 15 [139,140].

Mezi základní parametry hmotnostních analyzátorů patří rozlišovací schopnost, správnost určení m/z , hmotnostní rozsah, dynamický rozsah a rychlost. Hmotnostní analyzátory rozlišujeme podle způsobu dělení iontů na skenující, průletové, iontové pasti a analyzátory pohyblivosti iontů.

Skenující analyzátory postupně mění skenovanou veličinu a propouští ionty o určité m/z k detektoru. Mezi hlavní zástupce patří kvadrupólový analyzátor (Q), který se skládá ze čtyř stejných tyčí kruhového průřezu o délce 20-30 cm. Využívá se dvou složek elektrického pole, a to stejnosměrné a střídavé. Na dvě protilehlé tyče je vloženo kladné stejnosměrné napětí, na zbývající dvě záporné stejnosměrné napětí a na všechny tyče vysokofrekvenční střídavé napětí. Ionty jsou přiváděny z iontového zdroje do středu osy kvadrupólu, kde začínají oscilovat. Oscilace jsou stabilní pouze pro ion s určitou hodnotou m/z , který projde přes analyzátor na detektor podle poměru stejnosměrné a střídavé složky. Všechny ostatní ionty jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu. Výhody tohoto analyzátoru spočívají v jednoduchosti a nízké ceně.

Průletové analyzátory měří čas iontů potřebný pro překonání určité vzdálenosti. Hlavním zástupcem je analyzátor doby letu (TOF), kde jsou ionty urychleny napěťovým pulsem do letové trubice a dochází zde k jejich separaci na základě rozdílné doby letu k detektoru. Ionty s menší hmotností se pohybují rychleji a dostanou se dříve na detektor. Měření spekter probíhá velmi rychle. Hlavní výhodou je teoreticky neomezený hmotnostní rozsah.

Iontové pasti zadržují ionty pomocí napětí na elektrodách a následně je analyzují. Mezi hlavní zástupce patří prostorová iontová past, která je tvořena prstencovou elektrodou a dvěma koncovými elektrodami, na které je vloženo napětí. Ionty jsou krátkým napěťovým pulzem přivedeny do pasti a vhodnými poměry napětí, vloženého na kruhovou a dvě koncové

elektrody, jsou ionty zadrženy uvnitř pasti. Postupnou změnou napětí jsou ionty vypuzovány na detektor podle jejich hodnoty m/z . Mezi výhody tohoto analyzátoru patří nižší cena a možnost získání vícenásobných spekter (MS^n). Vedle prostorové iontové pasti se používá i tzv. lineární iontová past (IT).

Poslední skupinu tvoří analyzátory, z nichž některé představují kombinaci analyzátoru a detektoru současně. Hlavními zástupci jsou orbitální past (Orbitrap) nebo iontová cyklotronová rezonance (ICR). Iontová cyklotronová rezonance a orbitrap využívají k analýze získaných spekter Fourierovu transformaci.

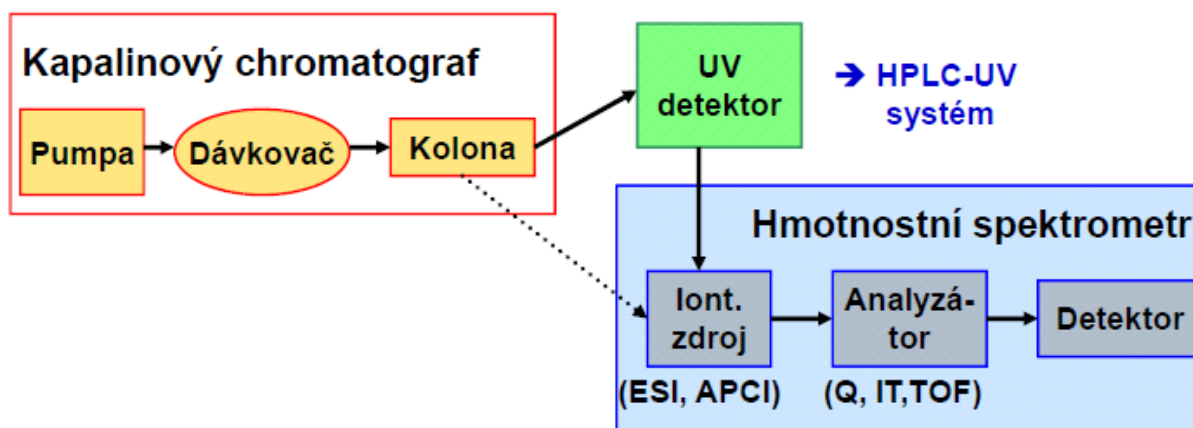
Detektory rozdělujeme do dvou základních skupin na detektory, které zaznamenají všechny ionty bez ohledu na poměr m/z a detektory, které zaznamenají i ionty ve vztahu k velikosti m/z . Princip první skupiny je založen na měření elektrického proudu, který vznikne při srážce s elektrodou a který je zesílen pomocí soustavy dynod. Hlavními zástupci jsou elektronový násobič, fotonásobič a Faradayova klec. Nejběžnějším je elektronový násobič, u kterého ionty dopadají na povrch elektrody, ze které vyrazí elektrony a ty jsou zesíleny opakovanými kolizemi či systémem dynod. U fotonásobiče ionty dopadají na konverzní dynodu, následně se uvolní elektrony, které dopadem na fosforovou destičku uvolní fotony, jež se zesílí ve fotonásobiči. Ve Faradayově kleci dopadající ionty narážejí na povrch dynody, která emituje elektrony a indukuje se zde proud, který je následně zesílen a zaznamenán. Mezi detektory, které zaznamenávají ionty i ve vztahu k velikosti m/z , patří orbitrap a ICR. Ionty se detekují jako proudový obraz veškerých iontů s odlišnými hodnotami m/z , pomocí indukce proudu, která vzniká v důsledku pohybu iontů v hmotnostním analyzátoru [139,140,142].

1.4.4 Spojení hmotnostní spektrometrie a vysokoúčinné kapalinové chromatografie

Výhodou využití spojení hmotnostní spektrometrie a vysokoúčinné kapalinové chromatografie (obrázek 16) je možnost analyzovat a identifikovat složitější směsi látek, u kterých je třeba analyzovat minoritní složky vedle majoritních. Využívá se výhod z obou technik. U HPLC vysoké schopnosti a účinnosti separace a MS má funkci velmi citlivého detektoru. Díky těmto výhodám je docíleno možnosti analyzovat netěkavé, velmi polární a termicky nestabilní látky. Problém při přímém spojení HPLC/MS je vysoký rozdíl tlaků mezi iontovým zdrojem a hmotnostním analyzátozem. Způsob ionizace se volí podle typu analyzovaného vzorku. Nejpoužívanějšími ionizačními technikami jsou ESI, APCI a APPI. Technicky je toto spojení daleko náročnější než spojení plynové chromatografie a hmotnostního spektrometru (GC/MS), jelikož je nutno odstranit kapalnou mobilní fázi

před vstupem do vakuové části přístroje. Toto bylo úspěšně vyřešeno použitím ionizačních technik za atmosférického tlaku, jelikož se zde mobilní fáze přímo účastní ionizace. Po zavedení těchto technik se stalo spojení HPLC/MS rutinní. Výsledek analýzy je záznam intenzity vybraných m/z v čase.

Výsledkem jedné HPLC/MS analýzy může být chromatogram celkového iontového proudu (TIC), rekonstruovaný iontový chromatogram (RIC) nebo MS spektra píků [131].



Obrázek 16: Schéma spojení HPLC/MS [139].

1.5 Stanovení fenolických látek v medu respektive v medovinách pomocí chromatografických a elektromigračních metod

Základem pro stanovení jednotlivých fenolických sloučenin je jejich izolace (extrakce) z matrice vzorku, separace, identifikace a kvantifikace [37,38].

Vzhledem k nízké koncentraci látek, které jsou stanovovány, je nezbytné před vlastní instrumentální analýzou medu vzorek obohatit a přečistit. Během tohoto kroku, který je časově náročný, může dojít ke ztrátě některých stopových analytů. Obecně platí, že pro analýzu fenolických kyselin a flavonolů v medu, musí být odstraněny cukry [37,143]. Nejpoužívanější obohacovací metodou v tomto případě je extrakce v systému kapalina-kapalina, kde se jako rozpouštědlo obvykle používá ethylacetát, ethanol [37] nebo diethyl ether [144]. Tato metoda je obvykle zaměřena na izolaci aglykonů [37]. Další metoda, která se používá pro stanovení fenolických látek je extrakce tuhou fází (SPE), mezi jejíž výhody patří univerzálnost, rychlost separace, nízká spotřeba reakčních činidel, nízká cena, vysoký obohacovací faktor, jednoduchost a vysoká účinnost. SPE má důležitou roli v předběžné úpravě vzorku medu a medoviny [37,145,146]. Při této metodě se používají extrakční patronky (kolonky) s polystyrénovými, neiontovými sorbenty typu

Amberlite XAD [38] nebo Bond Elut C18 [146], či silně kyselými ionexovými pryskyřicemi, jako je například Dowex 50WX8 [146]. Vzorek se smísí s pěti díly vody, okyselí se kyselinou chlorovodíkovou na pH 2, zfiltruje se přes vatou, aby došlo k odstranění pevných částic a následně se aplikuje do patronky se sorbentem, kde dojde k oddělení analytu od matrice. Fenolické sloučeniny zůstanou na kolonce, zatímco cukry a jiné polární sloučeniny se eluují s vodným rozpouštědlem, což vede k záchytu flavonoidů z více než 95 %. Kolona se promyje okyselenou vodou (pH 2, s kyselinou chlorovodíkovou) a následně destilovanou vodou. Celá fenolická frakce se potom eluuje methanolem a vysuší se za sníženého tlaku při teplotě 40 °C [38]. Mezi další metody extrakce flavonoidů patří mikrovlnné extrakce (MAE) a ultrazvuková extrakce (UE). Výhody jsou snížení doby extrakce a zvýšení výtěžků. Nevýhoda MAE je nízká selektivita a u UE pokles obsahu extrahovaných složek v důsledku rozkladných procesů [37,147]. Pro izolaci polyfenolických kyselin a flavonoidů jsou vhodné také extrakční metody, jako je superkritická fluidní extrakce (SFE), či techniky zrychlené extrakce rozpouštědlem (PLE) [37].

Pro analýzu fenolických látek se obvykle používá vysoce účinná kapalinová chromatografie v systémech s obrácenými fázemi s kolonami typu C18, resp, C8 [37,38,148]. Vedle těchto RP-HPLC separačních systémů mohou být k separaci použity i kolony plněné Sephadexem, neupraveným silikagelem či polyamidem [15]. Výhodou je možnost použití monolitických kolon, jejichž hlavními přednostmi jsou vynikající hydrodynamické vlastnosti, které umožňují zvýšit průtok mobilní fáze [37]. Ukázkou používaných kolon jsou např. Ascentis C18 (Supelco) [146], Gemini C18 (Phenomenex) [120], C18 Sunfire TM (Waters) [101], LiChroCART RP-18 (Merck) [148,149], Shimadzu LC-18 (Shimadzu) a mnoho dalších.

Nejčastěji se využívá gradientové eluce [15,37,38,120,146] s několika druhy mobilních fází, ale vždy se jedná o binární systémy [15,37,146], které obsahují vodnou složku a méně polární organické rozpouštědlo (například acetonitril nebo methanol). Do vodné fáze jsou obvykle přidávány kyseliny (například kyselina mravenčí, octová nebo fosforečná) za účelem snížení hodnoty pH mobilní fáze, což je nutné pro separaci fenolických kyselin [37,38]. Jako vodná složka mobilní fáze mohou být použity např. 2 mM kyselina mravenčí o pH 2,7 [146], 5 mM octan amonný o pH 3 (nastaveno pomocí HCOOH) [120] nebo 5% kyselina mravenčí [101,148-150] a organickou složkou mobilní fáze je téměř vždy 100% metanol [101,132,148-150], ale můžeme zvolit i směs 5 mM octanu amonného s ACN (1:2) o pH 3 (nastaveno pomocí HCOOH) [120]. Teplota kolony může být 25 °C [146] nebo 35 °C [120,148,149] a průtok se podle typu kolony obvykle volí

1 ml/min [101,146,148-150]. Detekčním systémem je nejčastěji detektor s diodovým polem [143] s vlnovými délkami detekce 254 nm [146,150], 290 nm [38,101,148-150], 320 nm [151], 340 nm [38,101,148], 370 nm [101], nebo detekce fluorescenční [37].

Plynová chromatografie byla použita pro analýzu flavonoidů již na počátku roku 1960. Derivatizované flavonoidy se oddělí pomocí silikonové polymerní kolony SE-30 s tepelně vodivostní detekcí. Frakce byly sbírány pro oblast infračerveného záření (IR) a ultrafialovou a viditelnou (UV-VIS) oblast ve spektroskopii. Od zavedení kapalinové chromatografie (LC), se analýza flavonoidů pomocí plynové chromatografie (GC) moc nepoužívá. Metody na bázi GC mají vysokou rozlišovací schopnost a nízké meze detekce, ale jsou pracné vzhledem k tomu, že je nutné provést derivatizaci z důvodu, že většina sloučenin se nevyskytuje v těkavé formě. K derivatizaci se používají zejména methylované formy nebo trimethylsilyl deriváty. Flavonoidy však obsahují více než jednu hydroxylovou skupinu, proto mohou derivatizační reakce poskytovat několik derivátů, s čímž souvisí následná obtížná kvantifikace. Při průběhu derivatizace pro GC dojde nejprve k hydrolýze flavonoidů a následně k jejich převedení na trimethylsilyl (TMS) deriváty (nejčastějšími derivatizačními činidly jsou N-(terc-butyldimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamid (TBDMS) a N,O-bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamid (BSTFA), které se zavedou na nepolární DB-5 nebo DB-1 kolonu, a to buď v režimu split, nebo splitless. Separace probíhá pomocí lineárního teplotního programu 30-90 min (nejvýše 300 °C) s EI-MS detekcí. Publikace o GC analýze flavonoidů se zaměřují na antioxidační aktivitu flavonoidů, metabolismus a taxonomii v oblasti biologie a potravinářství [15,37].

Kapilární elektroforéza (CE) se stala dobrou alternativou nebo také doplňkem chromatografických separací. Kapilární elektroforéza byla používána jako alternativní technika HPLC pro analýzu fenolických sloučenin v medu. Použití detekční metody CE s připojením na MS kombinuje vysokou rychlost a efektivitu CE se selektivitou a citlivostí MS. Navzdory výhodám CE existuje málo publikací zabývajících se stanovením polyfenolů v medu pomocí CE. U kapilární zónové elektroforézy (CZE) se používají elektrolyty na bázi boritanu a u micelární elektrokinetická chromatografie (MECK) elektrolyty na boritanové bázi s dodecylsulfátem sodným (SDS) jako micelárním činidlem. MECK metody jsou používány hlavně pro studium flavonoidů v medu a CZE analyzuje celé polyfenolické frakce medu. Tato metoda poskytuje selektivně-strukturní informace o analytech v maticích. Ve srovnání s chromatografickými metodami je tato metoda dobrou alternativou pro simultánní analýzu fenolových složek v medu. Výhody této metody jsou spojení vysoké rychlosti a rozlišení, jednoduchosti a nízkých provozních nákladů [38].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Přístroje a zařízení

Látky s antioxidační aktivitou byly analyzovány na kapalinovém chromatografu ve spojení s hmotnostním spektrometrem QTRAP 4500 (AB SCIEX, Framingham USA). Kapalinový chromatograf obsahoval:

- 2 čerpadla mobilní fáze LC-20AD (Shimadzu, Kyoto, Japonsko; vysokotlaký gradient)
- směšovač mobilní fáze (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)
- autosampler SIL-20A (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)
- termostatat kolon LCO 102 single (Ecom, Praha)

Fenolické látky byly separovány na koloně Ascentis Express C 18 (délka 150 mm, průměr 3,0 mm, zrnitost 2,7 μm , Supelco, Belfonte, USA).

Pro přípravu vzorků i standardů byly použity mikropipety s nastavitelným objemem Biohit-Proline (Biohit, Finsko) a digitální váhy Sartorius ED 224 S-OCE (Sartalex, Ústí nad Labem). Extrakce vzorků byly provedeny na třepačce REAX 2 (Heidolph, Německo). Pro urychlení sedimentace byla použita centrifuga Universal 320 (Hettich, Německo). Vzorky byly odpařovány na sušící vaně (Miulab, Čína) s přívodem dusíku. Přechištění bylo provedeno pomocí stříkačkových polytetrafluorethylenových (PTFE) filtrů o velikosti pórů 0,45 μm (Labicom, Česká republika).

2.2 Použité chemikálie

2.2.1 Chemikálie

Na přípravu vzorků, standardů a mobilních fází byl použit HPLC/MS acetonitril (Sigma Aldrich, USA) a redestilovaná voda, která byla připravena pomocí zařízení Mili-Q (Merck, Německo). Jako přídavek do mobilní fáze byla použita kyselina mravenčí (Sigma Aldrich, USA). Dalé byly použity chemikálie: diethylether a ethylacetát (Lach-ner, Neratovice), 35% kyselina chlorovodíková (J.T.Baker, Nizozemsko) a methanol (Sigma Aldrich, USA)

2.2.2 Vzorky

Použité vzorky medovin jsou uvedené v tabulce 5.

Tabulka 5: Vzorky medovin.

Číslo vzorku	Název medoviny	Výrobce	Obj % alkoholu
1.	Staroslovenská medovina	Včela PRO, Jan Löffelmann	13,0
2.	Medovina „Medvědí objetí“	Medovinka s.r.o., Hlinsko	13,0
3.	Staročeská medovina	včelařství Sláma, Havlíčkův Brod	-
4.	Přibyslavská medovina, medovicová	M. Zelený, Nové město n. Metují	-
5.	Přibyslavská medovina, slunečnicová	M. Zelený, Nové město n. Metují	-
6.	Přibyslavská medovina, lípa	M. Zelený, Nové město n. Metují	-
7.	Medovina (z plastu)	Ing. Petr Kudláč – APIMED Dolná Krupá, Slovensko	-
8.	Medové víno z Českého lesa s jablečnou příchutí (cyser)	J. Lstibůrek, Domažlice	11,5
9.	BIO medovina	včelařství Sláma, Havlíčkův Brod	13,0
10.	Originální medovina z kunětických strání	E. Báchor, Pardubice	-
11.	Tmavá staroslovanská medovina z lesního medu	Ing. Petr Kudláč – APIMED Dolná Krupá, Slovensko	13,5
12.	Medové víno z Českého lesa, archivní	J. Lstibůrek, Domažlice	13,5
13.	Keltská medovina	Sznepka, Hlučín	11,6
14.	Domácí jemná medovina	Vinařství UHER Josef	-
15.	Medové víno z Českého lesa s rybízovou příchutí	J. Lstibůrek, Domažlice	14,0
16.	Medovina z Vysočiny	včelařství Sláma, Havlíčkův Brod	13,0
17.	Včelovina	Včelco s.r.o., Smolenice, Slovensko	3,0
18.	Křivoklátská medovina	Jan Halada, ČESKÁ VČELA s.r.o., Rakovník	18,0
19.	Medové Velkomoravské	NATUREL s.r.o. ve spolupráci s Ing. Markem Sznepkou, Třebechovice pod Orebem	11,3
20.	Medovina lípa	M. Zelený, Nové město n. Metují	-
21.	Medovina jarní	M. Zelený, Nové město n. Metují	12,5
22.	Medovina luční	M. Zelený, Nové město n. Metují	-

2.2.3 Standardy

Pro identifikaci látek a přípravu kalibračních roztoků byly použity standardy jednotlivých fenolických látek (Tabulka 6). Jejich struktury jsou uvedeny na obrázku P1. Všechny standardy pocházely od firmy Sigma-Aldrich (USA).

Tabulka 6: Standardy fenolických látek.

Deriváty kyseliny benzoové	galová kyselina
	gentisová kyselina
	vanilová kyselina
	3,4-dihydroxybenzoová kyselina
	4-hydroxybenzoová kyselina
	syringová kyselina
	salicylová kyselina
Deriváty kyseliny skořicové	ferulová kyselina
	kávová kyselina
	p-kumarová kyselina
	m-kumarová kyselina
	isoferulová kyselina
Flavonoidy	apigenin
	epikatechin
	katechin
	myricetin
	kvercetin
	taxifolin
	luteolin
Glykosidické estery	chlorogenová kyselina
Glykosidy flavonoidů	rutin
Fenolické aldehydy	vanilin
	3,4-dihydroxybenzaldehyd

2.3 Pracovní postup

2.3.1 Příprava standardů

Standardy jednotlivých látek byly naváženy a rozpuštěny v methanolu tak, aby jejich koncentrace byla 1 g/l. Tyto roztoky byly následně naředěny na tři koncentrační úrovně: 50 µg/ml (3,4-dihydroxybenzaldehyd (3,4-DHBA), 4-HBA, kyselina chlorogenová, kyselina syringová, rutin, kyselina kávová, kyselina ferulová, taxifolin, epikatechin), 10 µg/ml (kyselina galová, 3,4-DHB, vanilin, kyselina vanilová, myricetin, katechin, kyselina isoferulová, kyselina p-kumarová, kyselina m-kumarová, kyselina salicylová, kvercetin, luteolin, apigenin) a 0,5 µg/ml pro kyselinu gentisovou společně do 10ml odměrné baňky.

Z tohoto roztoku byla potom připravena desetibodová kalibrační řada odpipetováním 0,002 – 1 ml do 10ml odměrné baňky a doplněním methanolem po rysku ve třech kalibračních hladinách 0,01 – 5 µg/ml pro první skupinu, resp. 0,002 – 1 µg/ml pro druhou skupinu a 0,1 ng/ml – 50 ng/ml pro kyselinu gentisovou.

2.3.2 Příprava vzorků

Pro přímou analýzu medovin byly vzorky jednotlivých medovin naředěny 10 × směsí složek A a B mobilní fáze v poměru 80:20 a přefiltrovány přes stříkačkový PTFE filtr o velikosti pórů 0,45 µm.

Při analýze extraktů medovin byly vzorky zakoncentrovány extrakcí z kapaliny do kapaliny (LLE) s následným odpařením extrakčního rozpouštědla do sucha. Bylo smícháno 10 ml vzorku medoviny s 15 ml diethyletheru a 15 ml ethylacetátu. Směs byla okyselená 150 µl 35% kyseliny chlorovodíkové a byla třepána 20 min. Pro urychlení sedimentace byla směs centrifugována po dobu 10 min. Vrchní organická vrstva byla převedena do plastové kónické zkumavky, extrakční rozpouštědlo bylo odpařeno do sucha a odparek byl následně rozpuštěn v 2 ml 20% acetonitrilu ve vodě. Na závěr byla celá směs zfiltrována pomocí stříkačkových PTFE filtrů o velikosti pórů 0,45 µm a k vlastní analýze ředěna 10 × nebo 50 × směsí složek A a B mobilní fáze v poměru 80:20.

2.3.3 Podmínky měření

Separace probíhala na koloně Ascentis Express C18 o délce 150 mm, průměru 3,0 mm a zrnitosti 2,7 µm. Pro separaci byla zvolena teplota 30°C. Mobilní fáze byly složeny z redestilované vody okyselené 0,3% kyselinou mravenčí (A) a acetonitrilu (B). Průtok mobilní fáze byl 0,6 ml/min a dávkované množství vzorku bylo zvoleno 2 µl. Použitý gradient je znázorněn v tabulce 7.

Tabulka 7: Gradient.

Čas [min]	Koncentrace acetonitrilu [%]
0	10
0,1	23
3	24
4	50
5	60
6	10

Optimalizace monitorování specifických přechodů (MRM) byla provedena pomocí přímé infúze směsí standardů fenolických látek do hmotnostního spektrometru. Byly snímány záporné ionty po ionizaci elektrosprejem (ESI-). Pro optimalizaci byly využity fenolické látky viz tabulka 6.

Hmotnostní spektrometr při přímé infúzi pracoval za následujících podmínek:

Průtok 5 – 10 $\mu\text{l}/\text{min}$, ESI-, curtain gas 10, collision gas – medium, ion spray voltage -4500 V, ion source gas 1 – 20, ion source gas 2 – 0, entrance potential -10, declustering potential – v závislosti na sloučenině (-60 V až -190 V).

Podmínky pro HPLC/MS:

Průtok 0,6 ml/min, ESI-, curtain gas 20, collision gas – medium, teplota 400 °C, ion spray voltage -4500 V, ion source gas 1 – 40, ion source gas 2 – 50, entrance potential -10, parametry – declustering potential (DP), MRM přechody, kolizní energie (CE) a výstupní potenciál kolizní cely (CXP) jsou uvedeny v tabulce 8 v diskuzní části.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Optimalizace HPLC/MS

Nejprve byla provedena optimalizace separace dvaceti tří fenolických látek s cílem dosáhnout maximální rychlosti separace a minimální koeluce. Pro zvýšení účinnosti separace byla použita kolona plněná povrchově porézními částicemi. Byla optimalizována koncentrace kyseliny mravenčí v mobilní fázi, počáteční koncentrace acetonitrilu a strmost gradientu. Počáteční koncentrace acetonitrilu byla nastavena tak, aby nejméně zadržová kyselina galová eluovala přibližně minutu za mrtvým objemem kolony. Tento čas byl potřebný pro odstranění polárních látek z matrice, které by ovlivňovaly MS analýzu. Z důvodu velkého zpoždění gradientu u použitého systému byla volena skoková změna koncentrace mobilní fáze pro urychlení eluce látek separujících se po kyselině galové. Následovala optimalizace strmosti gradientu s cílem oddělit látky se stejnou molární hmotností či stejnými MRM přechody, tedy takové, jež nelze rozlišit pomocí hmotnostní spektrometrie. Zejména se jednalo o isomery kyseliny ferulové, které se strukturně velmi podobají a často dochází k jejich koeluci. Optimální eluce studovaných fenolických látek bylo dosaženo s využitím gradientové eluce s průběhem gradientu, která je uvedena v tabulce 7 v experimentální části. Separace všech látek byla uskutečněna do 6 minut. Retenční časy jednotlivých fenolických látek jsou uvedeny v tabulce 8.

Tabulka 8: Optimalizované parametry pro MS analýzu.

Q1 – m/z izolované na prvním kvadrupólu, Q3 – m/z sledované na třetím kvadrupólu. DP – deklasterační potenciál, CE – kolizní energie, CXP – výstupní potenciál kolizní cely

Látka	značení	Čas min	Q1 m/z	Q3 m/z	DP V	CE V	CXP V
Galová kyselina	1	1,56	168,70	124,90	-80	-20	-9
Gentisová kyselina	2	2,19	152,80	107,90	-50	-30	-9
3,4-dihydroxybenzoová kyselina	3	2,19	152,90	108,97	-70	-22	-9
Chlorogenová kyselina	4	2,43	352,80	190,80	-60	-30	-9
Epikatechin	5	2,53	288,85	244,91	-95	-22	-7
Katechin	6	2,53	288,80	244,90	-110	-24	-9
3,4-dihydroxybenzaldehyd	7	2,71	136,80	107,90	-90	-30	-9
4-hydroxybenzoová kyselina	8	2,76	136,85	92,90	-5	-24	-7
Kávová kyselina	9	2,92	178,80	134,90	-80	-22	-9
Vanilová kyselina	10	2,98	166,90	107,90	-60	-30	-9
Syringová kyselina	11	3,00	196,90	122,90	-75	-32	-8
Rutin	12	3,53	608,80	299,80	-130	-50	-5

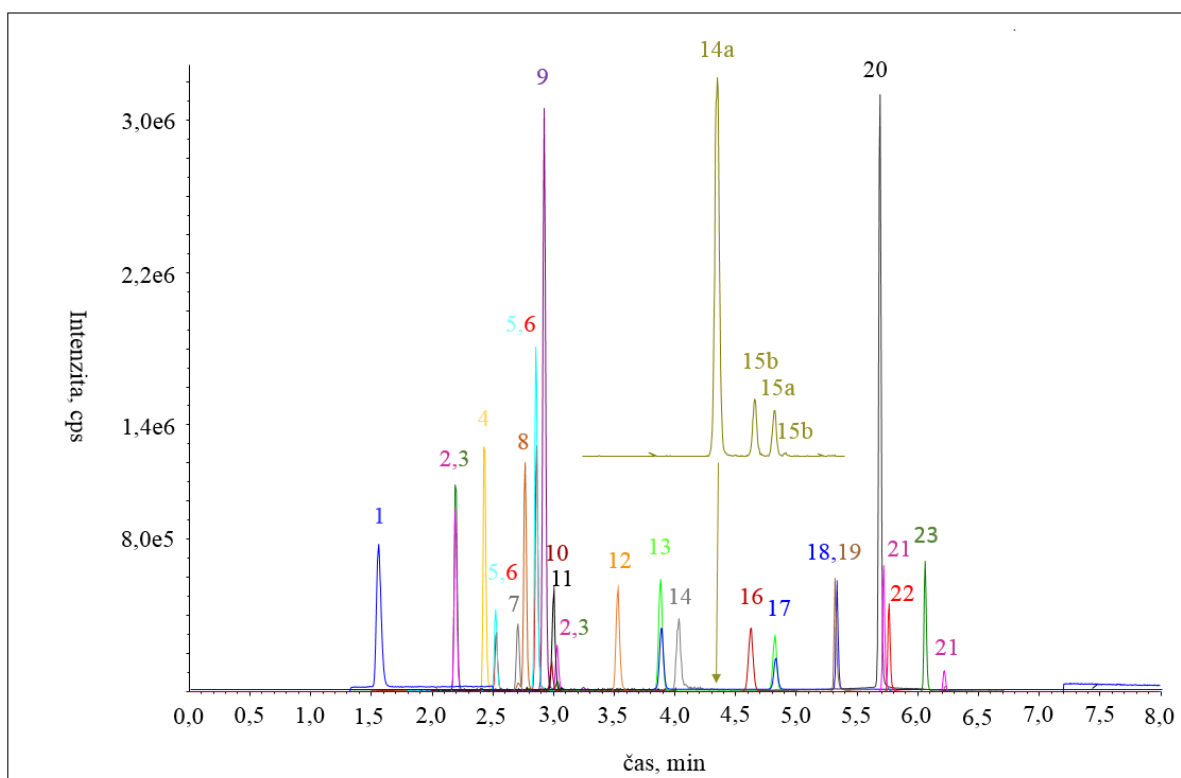
Látka	značení	Čas min	Q1 m/z	Q3 m/z	DP V	CE V	CXP V
p-kumarová kyselina	13	3,88	162,80	118,91	-65	-24	-9
Vanilin	14	4,03	150,90	136,00	-55	-20	-8
Ferulová kyselina (isomery)	15	4,34	192,80	133,90	-75	-24	-9
Taxifolin	16	4,63	302,80	284,90	-80	-18	-9
m,o-kumarová kyselina	17,18	4,82	162,81	118,90	-65	-24	-9
Myricetin	19	5,32	316,80	150,80	-100	-34	-7
Salicylova kyselina	20	5,69	136,80	92,90	-35	-24	-9
Luteolin	21	5,72	284,70	132,90	-160	-40	-6
Kvercetin	22	5,76	300,80	150,70	-100	-32	-11
Apigenin	23	6,00	268,80	116,90	-90	-40	-6

Optimalizace detekce po separaci vybraných fenolických látek byla provedena s využitím hmotnostního spektrometru Q-TRAP. Byla vybrána metoda monitorování MRM přechodů, při které je dosaženo vysoké citlivosti detekce a zároveň i vysoké selektivity. Nejprve byly optimalizovány jednotlivé parametry, jako je deklasterační potenciál (DP), kolizní energie (CE) a výstupní potenciál kolizní cely (CXP). Při správné volbě těchto parametrů je dosaženo vysoké citlivosti a velmi nízkých limitů detekce sledovaných látek. Pro každou látku byl optimalizován a vybrán jeden MRM přechod. Optimalizované parametry pro kvantitativní účely jsou uvedeny v tabulce 8.

Na obrázku 17 je zobrazena optimalizovaná separace látek. Optimalizace průběhu gradientu vyžadovala poměrně velkou časovou náročnost, jelikož často docházelo ke koeluci vysokého počtu látek. Tento jev nečiní problémy s detekcí pomocí MS, pokud se nejedná o detekci isomerů nebo látek o stejné molekulové hmotnosti, jelikož často tyto látky vykazují stejné MRM přechody. Proto byla naše optimalizace zaměřena hlavně na rozdělení čtyř isomerů kyseliny ferulové, které jsou znázorněny v horní části obrázku 17. Kyselina ferulová, vzhledem ke své struktuře, se může vyskytovat v cis- a trans-formě. Navíc se může ještě dále lišit absolutní konfigurací skupin navázaných na dvojnou vazbu. Proto jsou i na záznamu celkem čtyři píky příslušející cis-, resp. trans-formě, vždy v páru podle absolutní konfigurace.

3.2 Kvantifikace fenolických látek

Kvantitativní stanovení bylo provedeno pomocí metody kalibrační křivky. Koncentrační rozsahy jednotlivých analyzovaných látek byly rozděleny na tři úrovně tak, aby nebyl překročen limeární rozsah odezvy hmotnostního detektoru. Jednotlivé kalibrační roztoky byly



Obrázek 17: Optimalizovaná separace látek.

(1–galová kyselina, 2–gentisová kyselina, 3–3,4-DHB, 4–chlorogenová kyselina, 5–epikatechin, 6–katechin, 7–dihydroxybenzaldehyd, 8–4-HBA, 9–káвовá kyselina, 10–vanilová kyselina, 11–syringová kyselina, 12–rutin, 13–p-kumarová kyselina, 14–vanilín, 15–isomery kyseliny ferulové (15a-trans-, 15-iso-forma), 16–taxifolin, 17–m-kumarová, 18–o-kumarová kyselina, 19–myricetin, 20–salicylová kyselina, 21–luteolin, 22–kvercetin, 23–apigenin)

Kolona: Ascentis C18 délka 150 mm, průměr 3,0 mm a zrnitosti 2,7 μm , mobilní fáze: viz experimentální část, průtok: 0,6 ml/min, teplota: 30 $^{\circ}\text{C}$, dávkování 2 μl , detekce: MS, MRM přechody viz tab. 8.

změřeny celkem dvakrát na deseti koncentračních hladinách. Výsledky kalibračních měření jsou uvedeny v tabulce P1 v příloze. Regresní diagnostika byla provedena v programu QC Expert 3.3 (TriloByte, ČR). Nejprve byla provedena kritika dat a následně bylo využito grafických diagnostik (Pregibonův graf, Williamsův graf, L-R graf, Jackknife rezidua a McCulloh-Meterův) na odhalení a odstranění vlivných bodů. Na závěr byla uskutečněna kritika metody a modelu na hladině významnosti 95 %. Na základě těchto testů nebyly ve většině případů do výpočtu regresní závislosti zahrnuty body odpovídající nejnižší a nejvyšší koncentraci. Významnost regresních parametrů byla testována pomocí Studentova t-testu.

Regresní parametry lineární závislosti ploch pod píkem na koncentraci látek vyjádřené v ng/ml (úsek a směrnice) jsou uvedeny spolu s vypočtenými směrodatnými odchylkami v tabulce 9. Dále je zde uveden koeficient determinace (R^2), mez detekce (LOD)

a stanovitelnosti (LOQ), které byly stanoveny jako trojnásobek (LOD) a desetinásobek (LOQ) odstupu signálu od šumu. Ve většině případů je limit kvantifikace v oblasti mezi prvním a druhým nejnižším měřeným kalibračním standardem. Vzhledem k vyloučení nejnižšího kalibračního standardu z výpočtu kalibrační závislosti lze konstatovat, že využitelný rozsah kalibrace se nachází nad limitem kvantifikace. Dva vzorky medovin (číslo 10 a 20) byly analyzovány 8 × a relativní směrodatná odchylka u opakovaného stanovení byla u obou vzorků menší než 1 %.

Tabulka 9: Regresní parametry, meze detekce a meze stanovitelnosti pro jednotlivé fenolické látky.

Látka	LOD [ng/ml]	LOQ [ng/ml]	Směrnice	Úsek	R ²
Galová kyselina	0,714	5,714	759900 ± 8000	-17933 ± 2166	0,9984
Katechin	2,800	9,333	102700 ± 1300	-221 ± 338 *	0,9973
3,4-DHB	0,387	1,290	1720194 ± 11469	-3207 ± 2613 *	0,9994
Chlorogenová kyselina	2,000	6,666	381307 ± 6313	-6644 ± 6366 *	0,9962
4-HBA	11,90	39,69	809862 ± 15947	47548 ± 16081 *	0,9946
Gentisová kyselina	0,517	1,709	2517 ± 54	-1946 ± 551	0,9934
Vanilová kyselina	2,589	8,630	6130 ± 53	392 ± 11	0,9996
Kávoá kyselina	4,489	14,96	2746567 ± 37176	93369 ± 47001*	0,9971
Epikatechin	14,28	47,61	128922 ± 1491	-6166 ± 1863	0,9980
Syringová kyselina	194,4	648,1	6913 ± 153	-17 ± 154 *	0,9931
Vanilin	7,352	24,48	86663 ± 448	32 ± 120 *	0,9996
p-kumarová kyselina	2,719	9,065	2303309 ± 45292	-17058 ± 9134 *	0,9946
m-kumarová kyselina	5,014	16,71	1175366 ± 23825	-7317 ± 4805 *	0,9943
Taxifolin	10,25	34,19	386374 ± 1103	3192 ± 1257	0,9989
Ferulová	11,83	39,44	81561 ± 1120	-2287 ± 1129 *	0,9974
Isoferulová kyselina	3,120	10,40	70167 ± 615	-359 ± 165 *	0,9989
Rutin	4,569	15,22	260652 ± 4370	-8805 ± 4406 *	0,9961
Myricetin	9,454	31,51	5725 ± 221	34 ± 12	0,9911
Kvercetin	0,686	2,286	1809675 ± 27181	-135794 ± 5478	0,9986
Apigenin	0,124	0,412	2240123 ± 32223	13566 ± 2711	0,9983
Salicylová kyselina	0,469	1,563	10726112 ± 143053	-42619 ± 36171 *	0,9972
3,4-DHBA	3,031	10,10	239644 ± 3195	16789 ± 4039 *	0,9972
Luteolin	0,960	3,200	332701 ± 3741	946 ± 2605	0,9980

*absolutní člen je nevýznamný, pravděpodobnost je větší než 0,05

3.3 Kvantifikace fenolických látek ve vzorcích medovin

Všech 22 vzorků medovin od různých dodavatelů bylo analyzováno postupem uvedeným v experimentální části. Podle charakteristických MRM přechodů jednotlivých fenolických látek byly tyto látky identifikovány v jednotlivých vzorcích a v případě pozitivního nálezu kvantifikovány s využitím dříve změřených kalibračních závislostí jednotlivých látek ve vzorcích a extraktech z nich připravených. Postup přípravy jednotlivých

extraktů je uveden v experimentální části. Všechny vzorky a extrakty byly proměřeny optimalizovanou HPLC/MS metodikou. Obsah fenolických látek ve vzorcích zjištěný přímou analýzou a analýzou s extrakčním krokem je porovnán v tabulce 10.

3.4 Vliv extrakce na nalezený obsah fenolických látek

V další části byl studován vliv extrakčního kroku na nalezený obsah fenolických látek. U některých fenolických látek byl jejich obsah nalezený přímou analýzou bez úpravy vzorku výrazně menší při analýzách s extrakčním krokem. Zároveň se podařilo identifikovat (a kvantifikovat) ve stejných vzorcích analýzou s extrakčním krokem větší počet fenolických látek. Toto bylo pravděpodobně způsobeno jednak zakoncentrováním vzorku během extrakce a zároveň matričním efektem. U některých látek může docházet k výraznému snížení ionizační účinnosti vlivem koeluce látek pocházejících z neodstraněné matrice. Tento jev se ovšem nevyskytoval u všech analyzovaných látek ve stejné míře a u některých látek bylo možno pozorovat i opačný trend. Proto nelze jednoznačně určit, zda je lepší analyzovat přímo medovinu nebo připravený extrakt. Porovnání chromatogramů získaných při HPLC/MS analýze neupravené medoviny (A) a extraktu (B) vzorku 15 (Medové víno z Českého lesa s rybízovou příchutí, J. Lstibůrek, Domažlice) je zobrazeno na obrázku 18. Z něj vyplývá vyšší počet nalezených látek ve vzorku medoviny upravené extrakcí než při přímé analýze.

Kvalitativní zastoupení fenolických látek při porovnání analýzy vzorku 22 (Medovina luční, M. Zelený, Nové město n. Metují) bez úpravy (A) a s využitím extrakce (B) je na obrázku 19. V tomto případě je vidět přibližně stejný profil nalezených látek, avšak v případě analýzy extraktu je intenzita záznamu vyšší a tudíž i nalezené množství látek zhruba o řád větší.

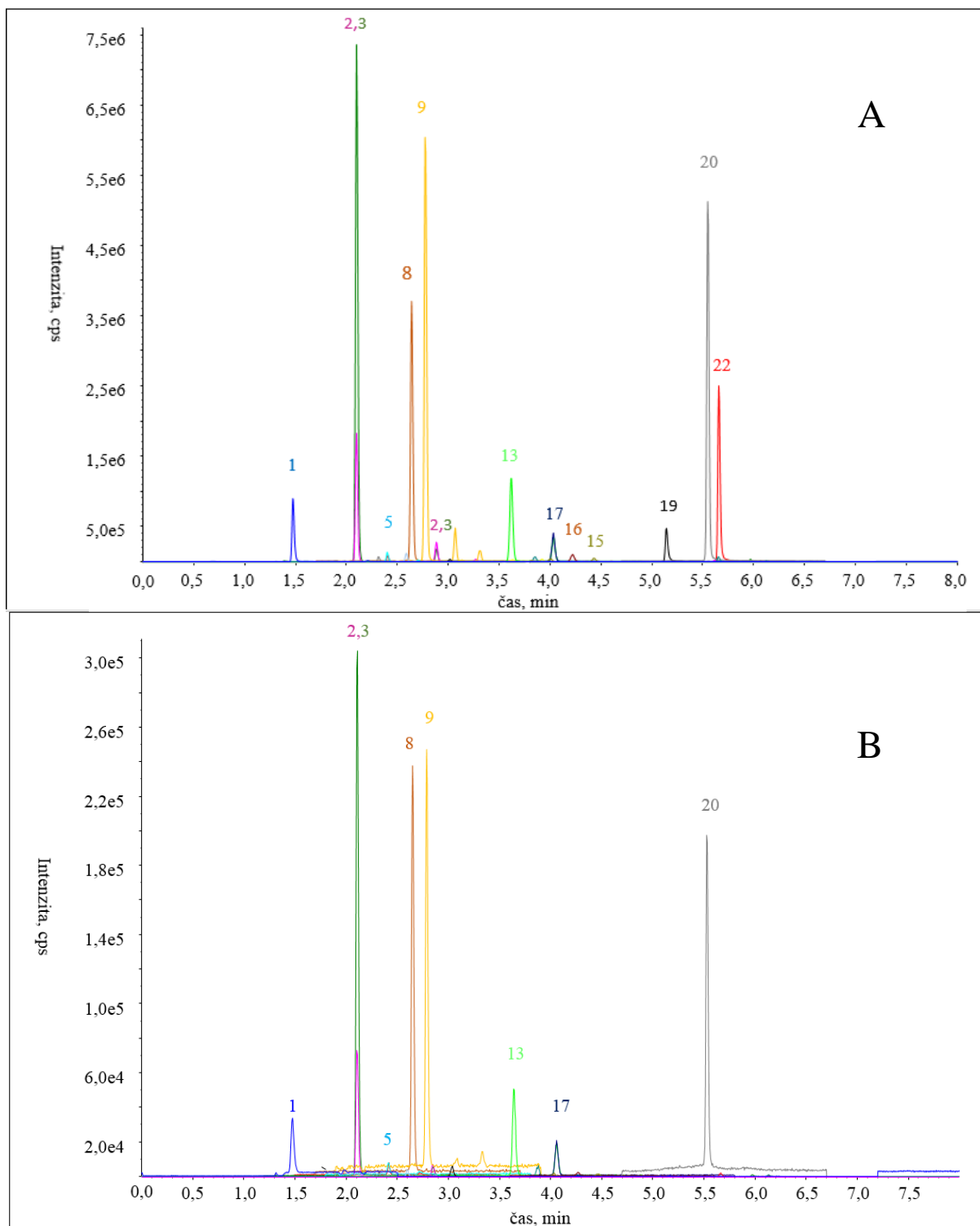
Z výsledků analýz nelze v tuto chvíli učinit žádné předběžné závěry např. o vlivu použité technologie na obsah fenolických látek v medovinách. Kvalitativní i kvantitativní profil nalezených látek se ve vzorcích značně lišil a pouze u vzorků od výrobce Miroslav Zelený (4,5,6,20,21,22) byla známá technologie výroby (nevařené medoviny). Ve vzorcích byly nečastěji ve vyšších koncentracích nalezeny následující fenolické látky: kyselina galová, 3,4-dihydroxybenzoová, 4-hydroxybenzoová, kávová, ferulová, salicylová, p-kumarová a kvercetin. Jako minoritní složky byly nejčastěji detekovány látky: kyselina chlorogenová, apigenin, 3,4-DHBA, myricetin, luteolin, katechin a epikatechin.

Tabulka 10: Kvantitativní zastoupení fenolických látek ve vzorcích medovin analyzovaných bez předchozí úpravy a s využitím extrakčního kroku
P – přímá analýza vzorku, E – analýza s extrakcí

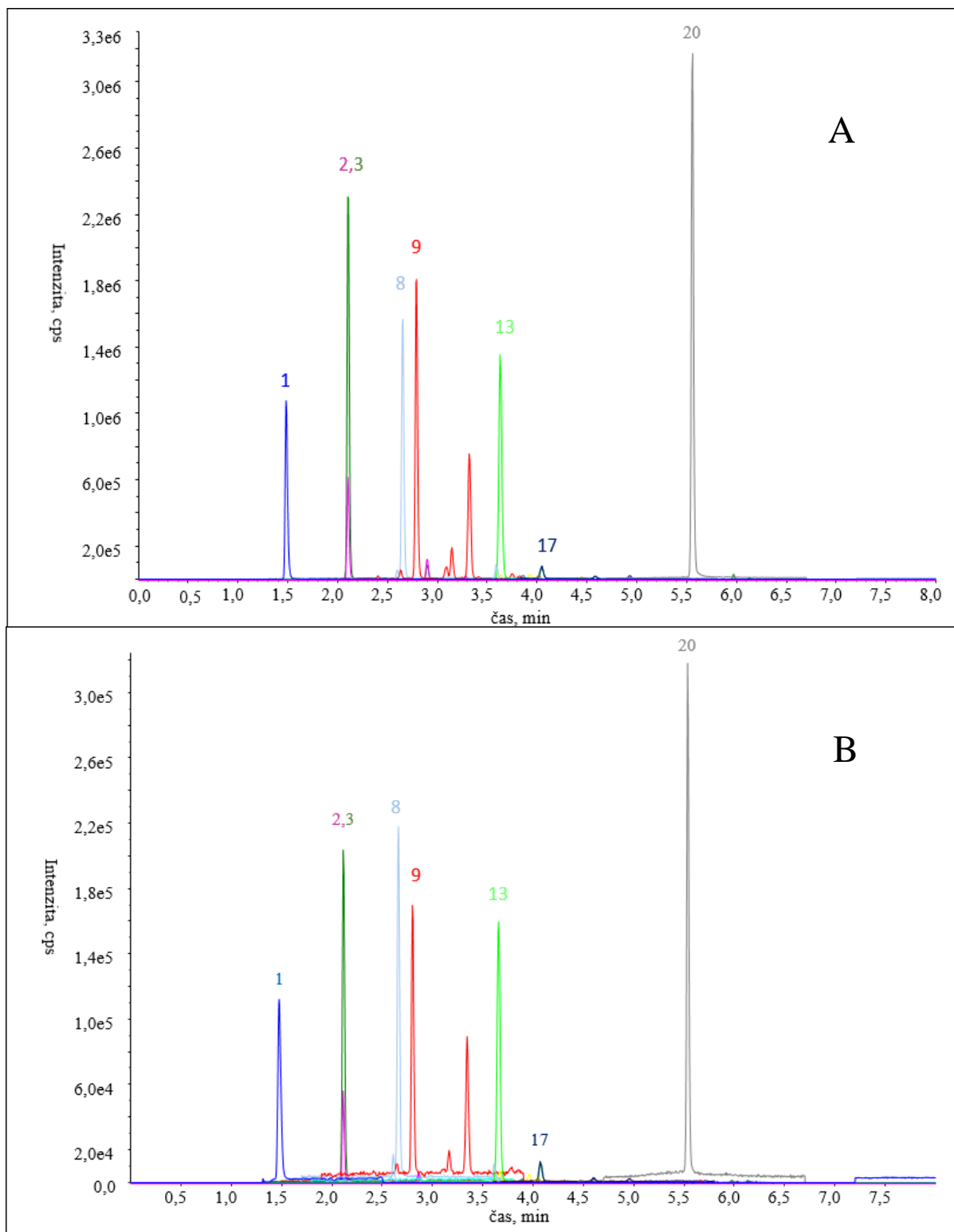
látko / vzorek		c [µg/l]										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Galová kyselina	P	<LOD	412,3	2420	1539	832,4	906,7	576,4	300,8	551,2	236,0	721,1
	E	<LOD	310,0	1460	3180	1870	1070	500,2	190,1	760,2	190,0	750,4
3,4-DHB	P	59,50	380,5	318,6	725,9	534,8	666,0	257,9	266,9	237,8	321,5	388,9
	E	50,01	1330	270,5	3560	2460	1540	1140	660,7	1120	1810	1180
3,4-DHBA	P	<LOQ	216,4	<LOQ	427,9	291,1	440,4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	127,3
	E	590,8	650,5	100,3	1060	930,5	570,7	1250	300	410	150	410
4-HBA	P	<LOD	495,3	1728	1918,	1068,	2127	987,2	1120	802,1	1061	1497
	E	<LOQ	1400	980,9	2500	2450	3790	1850	1660	2290	4280	2300
Vanilin	P	1166	12560	574,1	<LOQ	<LOD	<LOD	7826	<LOD	<LOD	<LOD	11432
	E	510,7	15540	390,3	180,7	<LOQ	100,4	9870	<LOD	70,22	<LOD	9490
Chlorogenová kyselina	P	2205	401,6	87,9	<LOD	199,1	<LOD	219,7	2852	199,4	<LOD	307,7
	E	770,6	710,0	70,09	10,38	410,9	30,63	240,8	375,1	415,0	10,42	420,7
Gentisová kyselina	P	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOQ	136,2	21,60	20,45	21,30
	E	<LOQ	20,99	30,08	120,1	20,22	20,22	30,62	570,3	80,88	50,66	60,82
Vanilová kyselina	P	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	E	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOD	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Myricetin	P	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	E	320,3	460,0	520,1	580,9	630,3	910,4	108,9	1500	1500	1440	1360
Syringová kyselina	P	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	E	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Rutin	P	<LOD	170,7	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD
	E	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Káвовá kyselina	P	22,59	<LOQ	304,6	533,6	188,9	263,6	206,9	2699	156,6	194,7	341,2
	E	<LOQ	385,8	291,2	2020	620,8	290,6	630,6	8010	760,8	1040	779,8

		c [$\mu\text{g/l}$]										
látka	vzorek	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	Ferulová kyselina	P	<LOD	<LOQ	763,5	800,3	915,1	866,8	2334	591,6	722,2	722,2
E		100,7	190,4	257,5	981,9	252,9	1390	1810	4500	1410	2050	2790
Isoferulová kyselina	P	<LOD	<LOQ	218,9	380,5	51,20	356,5	215,0	1213	<LOD	192,0	294,5
	E	<LOD	203,9	90,11	680,7	460,8	580,8	160,6	158,5	377,4	495,3	371,8
Katechin	P	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	226,0	8917	<LOD	443,1	<LOD
	E	<LOD	<LOD	40,55	<LOD	<LOD	40,10	60,62	60,02	60,83	30,75	50,66
Taxifolin	P	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	E	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOD
Epikatechin	P	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	622,6	9861	<LOD	<LOD	<LOD
	E	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	120,1	110,2	120,1	110,3	120,1	118,6
p-kumarová kyselina	P	122,2	173,8	538,6	628,2	145,1	715,5	592,5	928,2	398,3	540,5	859,5
	E	<LOD	40,63	30,01	108,7	40,25	1280	2070	3570	1610	50,99	50,34
m-kumarová kyselina	P	<LOD	<LOQ	<LOQ	<LOQ	239,8	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	E	<LOD	<LOQ	<LOD	50,61	190,8	320,1	10,52	10,04	<LOQ	0,02	<LOD
Salicylová kyselina	P	<LOD	63,60	73,30	200,1	96,39	148,7	61,69	78,75	82,91	183,3	76,90
	E	<LOD	70,77	40,31	67,88	21,33	230,8	80,33	110,7	260,3	500,4	90,78
Kvercetin	P	760,4	760,1	760,1	762,5	761,3	762,9	763,9	766,1	762,9	762,2	761,6
	E	150,0	150,0	150,0	150,0	150,0	150,0	176,8	1770	200,9	190,7	180,2
Luteolin	P	672,4	301,1	292,6	295,2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	E	20,09	40,09	30,62	40,23	34,89	31,93	30,29	55,89	32,80	49,75	30,25
Apigenin	P	11,29	8,312	7,908	8,754	8,324	8,477	7,652	7,617	8,200	7,512	9,108
	E	3,294	3,843	4,100	10,67	10,32	4,002	10,27	10,45	10,72	30,99	20,29

látka \ vzorek		c [µg/l]										
		12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Kávo kyselina	P	272,0	<LOQ	<LOQ	1409	148,5	558,0	<LOD	<LOQ	<LOQ	288,1	998,4
	E	1440	450,8	881,8	8428	160,6	350,8	<LOD	460,8	260,4	690,5	2208
Ferulová kyselina	P	450,9	561,1	529,8	758,3	791,0	728,9	280,4	426,6	999,1	692,4	1061
	E	1060	600,8	760,8	1100	1760	2020	1140	340,8	1300	639,8	1170
Isoferulová kyselina	P	493,1	167,4	258,1	518,8	237,0	300,5	<LOD	262,1	428,0	221,3	466,2
	E	330,8	680,8	1120	2650	1160	870,8	1030	490,9	450,9	460,8	850,8
Katechin	P	<LOD	<LOD	868,6	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	E	50,00	30,99	30,99	780,7	20,00	20,00	<LOQ	50,88	50,63	40,56	50,34
Taxifolin	P	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	E	<LOQ	<LOD	<LOQ	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Epikatechin	P	<LOD	<LOD	<LOD	868,6	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	E	110,9	110,5	150,8	620,5	100,0	100,9	100,9	100,4	119,8	103,9	104,8
p-kumarová kyselina	P	233,3	460,2	533,5	558,8	569,6	344,1	<LOQ	206,7	885,0	779,8	1560
	E	40,87	1690	2250	2670	2470	970,8	<LOD	460,8	2845	220,7	320,4
m-kumarová kyselina	P	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	339,2	<LOQ	<LOQ
	E	20,99	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ	72,00	140,8	80,88
Salicylová kyselina	P	488,8	61,62	78,51	321,4	82,44	65,61	53,00	59,72	175,1	233,2	479,0
	E	2820	130,8	360,8	1905	60,87	40,54	10,98	110,5	400,7	550,5	1582
Kvercetin	P	761,1	763,2	760,5	771,1	760,7	761,2	764,1	760,5	760,9	762,1	759,5
	E	160,8	150,7	155,9	5550	170,9	160,6	160,5	160,5	160,8	160,8	160,8
Luteolin	P	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	E	30,00	29,88	21,09	110,8	34,99	10,87	19,85	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Apigenin	P	8,907	7,145	6,853	8,523	7,901	8,203	7,704	7,494	8,322	7,203	8,754
	E	10,98	16,98	38,23	40,45	30,87	20,34	30,11	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ



Obrázek 18: Analýza neupravené medoviny č. 15 (A) a jejího extraktu (B).
 (číslování látek podle tab. 8 a obr. 17: 1–galová kyselina, 2–gentisová kyselina, 3–3,4DHB, 5–epikatechin, 8–4-HBA, 9–káвовá kyselina, 13–m-kumarová kyselina, 15–ferulová kyselina, 16–taxifolin, 17–m-kumarová kyselina, 19–myricetin, 20–salicylová kyselina, 22–kvercetin)
 Kolona: Ascentis C18 délka 150 mm, průměr 3,0 mm a zrnitosti 2,7 μm , mobilní fáze: viz experimentální část, průtok: 0,6 ml/min, teplota: 30 $^{\circ}\text{C}$, dávkování 2 μl , detekce: MS, MRM přechody viz tab. 8.

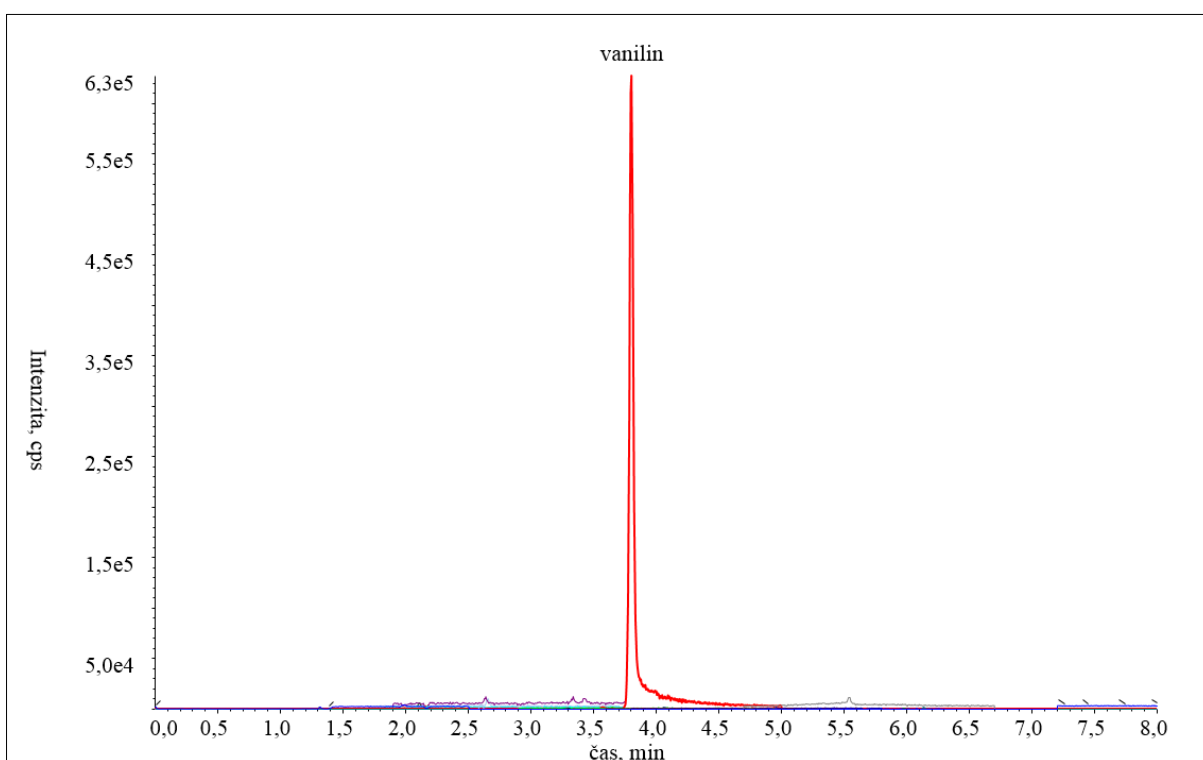


Obrázek 19: Analýza neupravené medoviny č. 22 (A) a jejího extraktu (B).

(číslování látek podle tab. 8 a obr. 17: 1–galová kyselina, 2–gentisová kyselina, 3–3,4DHB, 8–4-HBA, 9–kávová kyselina, 13–m-kumarová kyselina, 17–m-kumarová kyselina, 20–salicylová kyselina)

Kolona: Ascentis C18 délka 150 mm, průměr 3,0 mm a zrnitosti 2,7 μm , mobilní fáze: viz experimentální část, průtok: 0,6 ml/min, teplota: 30 $^{\circ}\text{C}$, dávkování 2 μl , detekce: MS, MRM přechody viz tab. 8.

Velice zajímavé jsou výsledky analýzy vzorku číslo 18 (Křivoklátská medovina, Jan Halada, ČESKÁ VČELA s.r.o, Rakovník). Zatímco na záznamech analýz všech ostatních vzorků lze nalézt více či méně pestrou směs fenolických látek, na záznamu analýzy tohoto vzorku dominuje pouze pík odpovídající vanilinu. Jeho intenzita a tedy i nalezená koncentrace ve vzorku je o několik řádů vyšší ve srovnání s ostatními medovinami. Naopak ostatní fenolické látky nebyly v tomto vzorku nalezeny v měřitelných koncentracích. Z tohoto zjištění lze usuzovat, že pro výrobu této „medoviny“ nebyl použit žádný med, ale nejspíše jen cukr, případně glukózo-fruktózový sirup (invertní cukr) spolu vanilinem s dalšími přídatnými látkami.



Obrázek 20: Analýza medoviny č. 18 upravené extrakcí.

Kolona: Ascentis C18 délka 150 mm, průměr 3,0 mm a zrnitosti 2,7 μm , mobilní fáze: viz experimentální část, průtok: 0,6 ml/min, teplota: 30 $^{\circ}\text{C}$, dávkování 2 μl , detekce: MS, MRM přechody viz tab. 8.

4 ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce byl stanoven obsah jednotlivých fenolických látek ve vzorcích medovin. Vzorky byly extrahovány směsí diethyletheru a ethylacetátu. Pro optimalizaci bylo vybráno 23 standardů fenolických látek, které se vyskytují v medovinách. Optimalizace probíhala v systémech s obrácenými fázemi na koloně plněné povrchově porézními částicemi, Ascentis Express C18 pomocí gradientové eluce. Obsah fenolických látek byl stanoven pomocí optimalizované HPLC/MS metody s využitím MRM přechodů. Byly nalezeny optimální hodnoty parametrů – deklasterační potenciál, kolizní energie a výstupní potenciál kolizní cely. S využitím těchto optimalizovaných podmínek separace byly sestrojeny kalibrační závislosti a stanoveny meze detekce a stanovení pro jednotlivé látky. Celkem ve 22 vzorcích medovin byl stanoven a porovnán obsah fenolických antioxidantů zjištěný přímou analýzou neupraveného vzorku a analýzou s využitím extrakčního kroku. Analýzy vzorků s využitím extrakce poskytují ve většině případů více látek, což bylo nejspíše způsobeno matričním efektem a potlačením ionizace. V případě přímé analýzy neupravených vzorků obsahem polární cukerné matrice. Obsah fenolických látek se značně lišil mezi jednotlivými analyzovanými vzorky, vždy se však jednalo o přítomnost více fenolických látek. Výjimkou byl jeden vzorek, kde byl nalezen pouze vanilin, a to v množství přesahujícím o několik řádů ostatní analyzované vzorky. V tomto případě to nejspíše svědčí o falzifikaci výrobku.

Vyvinutá analytická metoda je poměrně rychlá, vlastní HPLC/MS analýza trvá pouze 6 minut, během kterých je detekováno 23 fenolických antioxidantů v medovinách.

LITERATURA

- (1) CHEYNIER, Véronique. Phenolic compounds: from plants to foods. *Phytochemistry Reviews*. 2012. 11, 153-177.
- (2) BRAVO L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*. 1998. 56, 317-333.
- (3) WOLLGAST J., ANKLAM E. Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*. 2000. 33, 423-447.
- (4) ALU'DATT, M. A review of phenolic compounds in oil-bearing plants: Distribution, identification and occurrence of phenolic compounds. *Food chemistry*. 2017. 218, 99-106.
- (5) AMBRIZ-PÉREZ, D.L., LEYVA-LÓPEZ, N., GUTIERREZ-GRIJALVA, E.P., HEREDIA, J.B. Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. *Cogent Food & Agriculture*. 2016. 2, 7-8.
- (6) IBÁÑEZ E., CIFUENTES A. New analytical techniques in food science. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2001. 41, 413-450.
- (7) SEÑORÁNS F. J., IBÁÑEZ E., CIFUENTES A. New Trends in Food Processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2003. 43, 507-526.
- (8) GOLDBERG I. *Functional Foods, Designer Foods, Pharmafoods*. London: Chapman and Hall, 1996. ISBN: 978-1-4615-2073-3.
- (9) HERRERO M., IBÁÑEZ E., CIFUENTES A. Analysis of natural antioxidants by capillary eletromigration methods. *Journal of Separation Science*. 2005. 28, 883-897.
- (10) AMBRIZ-PÉREZ, D. L., LEYVA-LÓPEZ, N., GUTIERREZ-GRIJALVA, E. P., HEREDIA, J. B. Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. *Cogent Food & Agriculture*. 2016. 2, 7-8.
- (11) WONG-PAZ, J. E., CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C., RODRÍGUEZ-HERRERA, R., CARRILLO-INUNGARAY, M. L., LÓPEZ, L. I., NEVÁREZ-MOORILLÓN, G. V., AGUILAR C. N. Total phenolic content, in vitro antioxidant activity and chemical composition of plant extracts from semiarid Mexican region. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2015. 8, 104–111.
- (12) RE, R., PELLEGRINI, N., PROREGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., RICE-EVANS, C. Antioxidant aktivity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical and Biological Medicine*. 1999. 26, 1231-1237.

- (13) VELIOGLU, Y. S., MAZZA, G., GAO, L., OOMAH, B. D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1998. 46, 4113-4117.
- (14) WATERMAN, P. G., MOLE, S. *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1994. ISBN 0-632-02969-2
- (15) RIJKE, E., OUT, P., NIESSEN, W. M. A., ARIESE, F., GOOIJER, C., BRINKMAN, U. A. T. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*. 2006. 1112, 31-63.
- (16) MARGARITA, A., RICARDO, L. JUAN, F. C., VICENTE, F. Identification and quantification of impact odorants of aged red wines from rioja. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001. 49, 2924-2929.
- (17) SCHUSTER, B., HEMANN, K. Hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acid derivatives in soft fruits. *Phytochemistry*. 1985. 24, 2761.
- (18) MEYER, A. S., HEINONEN, M., FRANKEL, E. N. Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin and ellagic acid on human LDL oxidation. *Food Chemistry*. 1998. 61, 71-75.
- (19) KONO, Y., SHIBATA, H., KODAMA, Y., UEDA, A., SAWA, Y. Chlorogenic acid as a natural scavenger for hypochlorous acid. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 1995. 217, 972-978.
- (20) KHALIL, M., ALAM, N., MONIRUZZAMAN, M., SULAIMAN, S., GAN, S. Phenolic acid composition and antioxidant properties of Malaysian honeys. *Journal of Food Science*. 2011. 76, 921-928.
- (21) PIETTA, P. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Product*. 2000. 63, 1035-1042.
- (22) LAPIDOT, T., HAREL, S., AKIRI, B., GRANIT, R., KANNER, J. pH-dependent forms of red wine anthocyanins as antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1999. 47, 67-70.
- (23) NAYIK, G. A., SHAH, T. A., MUZAFFAR, K., WANI, S. A., GULL, A., MAJID, I., BHAT, F. M. Honey: Its history and religious significance: A review. *Universal Journal of Pharmacy*. 2014. 3, 5-8.
- (24) AL-WAILI, N. S., SALOM, K., BUTLER, G., AL GHAMDI, A. A. Honey and microbial infections: a review supporting the use of honey for microbial control. *Journal of Medicinal Food*. 2011. 14, 1079-1096.

- (25) LEE, D. S., SINNO, S., KHACHEMOUNE, A. Honey and wound healing: an overview. *American Journal of Clinical Dermatology*. 2011. 12, 181-190.
- (26) KWAKMAN, P. H., ZAAT, S. A. Antibacterial components of honey. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life* 2012. 64, 48-55.
- (27) ORYAN, A., ZAKER, S. R. Effects of topical application of honey on cutaneous wound healing in rabbits. *Zentralbl Veterinarmed A*. 1998. 45, 181-188.
- (28) BITTMANN, S., LUCHTER, E., THIEL, M., KAMEDA, G., HANANO, R., LANGLER, A. Does honey have a role in paediatric wound management? *British Journal of Nursing*. 2010. 19, 19-24.
- (29) ORYAN, A., ALEMZADEH, E., MOSHIRI, A. Biological properties and therapeutic activities of honey in wound healing: A narrative review and meta-analysis. *Journal of Tissue Viability*. 2016. 25, 98-118.
- (30) MANYI-LOH, C. E., CLARKE, A. M., NDIP, R. N. An overview of honey: therapeutic properties and contribution in nutrition and human health. *African Journal of Microbiology Research*. 2011. 5, 844-852.
- (31) WASIAK, J., CLELAND, H., CAMPBELL, F. Dressings for superficial and partial thickness burns. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2008. 4, 102-106.
- (32) SONG, J. J., SALCIDO, R. Use of honey in wound care: an update. *Advances in Skin & Wound Care*. 2011. 24, 40-44.
- (33) YAGHOUBI, R., KAZEROUNI, A., KAZEROUNI, O. Evidence for clinical use of honey in wound healing as an anti-bacterial, anti-inflammatory anti-oxidant and anti-viral agent: a review. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*. 2013. 8, 100-104.
- (34) LIU, J. R., YE, Y. L., LIN, T. Y., WANG, Y. W., PENG, C. C. Effect of floral sources on the antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of honeys in Taiwan. *Food Chemistry*. 2013. 139, 938-943.
- (35) FAIR, R. J., TOR, Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspectives in Medicinal Chemistry*. 2014. 28, 25-64.
- (36) TIRADO, D. J., HUDSON, N. R., MALDONADO, C. J. Efficacy of medical grade honey against multidrug-resistant organisms of operational significance: part I. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. 2014. 77, 204-207.
- (37) PYRZYNSKA, K., BIESAGA, M. Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. *Trends in Analytical Chemistry*. 2009. 28, 7.

- (38) GÓMEZ-CARAVACA, A. M., GÓMEZ-ROMERO, M., ARRÁEZ-ROMÁN, D., SEGURA-CARRETERO, A., FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006. 41, 1220–1234.
- (39) ALVAREZ-SUAREZ, J. M., TULIPANI, S., DIAZ, D., ESTEVEZ, Y., ROMANDINI, S., GIAMPIERI, F., DAMIANI, E., ASTOLFI, P., BOMPADRE, S., BATTINO, M. Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. *Food and Chemical Toxicology*. 2010. 48, 2490–2499.
- (40) BRUDZYNSKI, K., SJAARDA, C. Antibacterial compounds of Canadian honeys target bacterial cell wall inducing phenotype changes, growth inhibition and cell lysis that resemble action of b-lactam antibiotics. *PLoS ONE*. 2014. 9, 106-967.
- (41) MAJTAN, J., BOHOVA, J., HORNIACKOVA, M., KLAUDINY, J., MAJTAN, V. Anti-biofilm effects of honey against wound pathogens *Proteus mirabilis* and *Enterobacter cloacae*. *Phytotherapy Research*. 2014. 28, 69-75.
- (42) KATIRAEI, F., MAHMUDI, R., MARDANI, K., BABAEI, E. Antifungal activity of Iranian honeybees against *Candida*, *Aspergillus* species and *Trichophyton Rubrum*. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2014. 38, 2078-2082.
- (43) CANONICO, B., CANDIRACCI, M., CITTERIO, B., CURCI, R., SQUARZONI, S., MAZZONI, A., PAPA, S., PIATTI, E. Honey flavonoids inhibit *Candida albicans* morphogenesis by affecting DNA behavior and mitochondrial function. *Future Microbiology*. 2014. 9, 445-456.
- (44) ZAHOOR, M., NAZ, S., SANGEEN, M. Antibacterial, antifungal and antioxidant activities of honey collected from Timergara (Dir, Pakistan). *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014. 27, 45-50.
- (45) BRUDZYNSKI, K., ABUBAKER, K., ST-MARTIN, L., CASTLE, A. Reexamining the role of hydrogen peroxide in bacteriostatic and bactericidal activities of honey. *Frontiers in Microbiology*. 2011. 2, 213.
- (46) KNIGHT, A. The therapeutic effects of honey. *The Plymouth Student Scientist*, 2013. 6, 376-385.
- (47) MANDAL, M. D., MANDAL, S. Honey: its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2011. 1, 154-160.

- (48) BANG, L. M, BUNTTING, C., MOLAN, P. The effect of dilution on the rate of hydrogen peroxide production in honey and its implications for wound healing. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 2003. 9, 267-273.
- (49) KWAKMAN, P. H., DE BOER, L., RUYTER-SPIRA, C. P., CREEMERS-MOLENAAR, T., HELSPER, J. P, VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M., ZAAT, S. A. J., TE VELDE, A. A. Medical-grade honey enriched with antimicrobial peptides has enhanced activity against antibiotic-resistant pathogens. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2011. 30, 251-257.
- (50) BANAEIAN-BORUJENI, S., MOBINI, G. R., POURGHEYSARI, B., VALIDI, M. Comparison of the effect of honey and miconazole against *Candida albicans* in vitro. *Advanced Biomedical Research*. 2013. 30, 57.
- (51) MOLAN, P. C. Potential of honey in the treatment of wounds and burns. *American Journal of Clinical Dermatology*, 2001. 2, 13-19.
- (52) ROSSITER, K., COOPER, A. J., VOEGELI, D., LWALEED, B. A. Honey promotes angiogenic activity in the rat aortic ring assay. *Journal of Wound Care*. 2010. 19, 440-446.
- (53) SELL, S. A., WOLFE, P. S., SPENCE, A. J., RODRIGUEZ, I. A., MCCOOL, J. M., PETRELLA, R. L., GARG, K., ERICKSEN, J. J., BOWLIN, G. L. A preliminary study on the potential of manuka honey and platelet-rich plasma in wound healing. *International Journal of Biomaterials*. 2012. 313, 781.
- (54) AL-WAILI, N., SALOM, K., AL-GHAMDI, A. A. Honey for wound healing, ulcers, and burns; data supporting its use in clinical practice. *The Scientific World Journal*. 2011. 11, 766-787.
- (55) SINGH, M. P., CHOURASIA, H. R., AGARWAL, M., MALHOTRA, A., SHARMA, M., SHARMA, D., KHAN, S. Honey as complementary medicine: a review. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 2012. 3, 12-31.
- (56) AGGAD, H., GUEMOUR, D. Honey antibacterial activity. *Medicinal Aromatic Plants*. 2014. 3, 152.
- (57) MOORE, O. A., SMITH, L. A., CAMPBELL, F., SEERS, K., MCQUAY, H. J., MOORE, R. A. Systematic review of the use of honey as a wound dressing. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2001. 1, 2.
- (58) MADDOCKS, S. E., JENKINS, R. E. Honey: a sweet solution to the growing problem of antimicrobial resistance? *Future Microbiology*. 2013. 8, 1419-1429.

- (59) GEORGE, N. M., CUTTING, K. F. Antibacterial honey (Medihoney): in vitro activity against clinical isolates of MRSA, VRE, and other multi resistant gram-negative organisms including *Pseudomonas aeruginosa* Wounds. 2007. 19, 231-236.
- (60) ORTIZ-VAZQUEZ, E., CUEVAS-GLORY, L., ZAPATA-BAAS, G., MARTÍNEZ-GUEVARA, J., RAMÓN-SIERRA, J. Which bee honey components contribute to its antimicrobial activity? A review. *African Journal of Microbiology Research*. 2013. 7, 5758-5765.
- (61) SCHREML, S., SZEIMIES, R. M., KARRER, S., HEINLIN, J., LANDTHALER, M., BABILAS, P. The impact of the pH value on skin integrity and cutaneous wound healing. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2010. 24, 373-378.
- (62) STEWART, J. A., MCGRANE, O. L., WEDMORE, I. S. Wound care in the wilderness: is there evidence for honey? *Wilderness & Environmental Medicine*. 2014. 25, 103-110.
- (63) MOLAN, P. C. Re-introducing honey in the management of wounds and ulcers e theory and practice. *Ostomy Wound Management*. 2002. 48, 28-40.
- (64) NAKAJIMA, Y., NAKANO, Y., FUWANO, S., HAYASHI, N., HIRATOKO, Y., KINOSHITA, A., MIYAHARA, M., MOCHIZUKI, T., NISHINO, K., TSURUHARA, Y., YOKOKAWA, Y., LUCHI, T., KON, Y., MUKAI, K., KITAYMAMA, Y., MURAKADO, M., OKUWA, M., NAKATANI, T. Effects of three types of Japanese honey on full-thickness wound in mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013. 2013, 1-11.
- (65) VANDAMME, L., HEYNEMAN, A., HOEKSEMA, H., VERBELEN, J., MONSTREY, S. Honey in modern wound care: a systematic review. *Burns*. 2013. 39, 1514-1525.
- (66) MOLAN, P. C. Why honey is effective as a medicine 2. The scientific explanation of its effects. *Bee World* 2001. 82, 22-40.
- (67) MALIK, K. I., MALIK, M. A., ASLAM, A. Honey compared with silver sulphadiazine in the treatment of superficial partial-thickness burns. *International Wound Journal*. 2010. 7, 413-417.
- (68) NAYIK, G. A., NANDA, V. Effect of thermal treatment and pH on antioxidant activity of saffron honey by using response surface methodology. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2016. 10, 64-70.

- (69) NAYIK, G. A., DAR, B. N., NANDA, V. Optimization of the process parameters to establish the quality attributes of DPPH radical scavenging activity, total phenolic content and total flavonoid content of apple (*Malus domestica*) honey using response surface methodology. *International Journal of Food Properties*. 2016. 19, 1738-1748.
- (70) HOLDERNA-KEDZIA, E., KEDZIA, B. Research on an antioxidant capacity of honeys. *Acta Agrobotanica*. 2006. 59, 265-269.
- (71) NAYIK, G. A., NANDA, V. A chemometric approach to evaluate the phenolic compounds, antioxidant activity and mineral content of different unifloral honey types from Kashmir, India. 2016. 74, 504-513.
- (72) ANTONY, S. M., RIECK, J. R., DAWSON, P. L. Effect of dry honey on oxidation in turkey breast meat. *Poultry Science*. 2000. 79, 1846-1850.
- (73) MCLELLAN, M. R., KIME, R. W., LEE, C. Y., LONG, T. M. Effect of honey as an antibrowning agent in light raisin processing. *Journal of Food Process and Preservation*. 1995. 19, 1-8.
- (74) GHELDOF, N., ENGESETH, N. J. Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002. 50, 3050-3055.
- (75) GHELDOF, N., WANG, X. H., ENGESETH, N. J. Identification and Quantification of Antioxidant Components of Honeys from Various Floral Sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002. 50, 5870-5877.
- (76) MOLAN, P. C. The evidence and the rationale for the use of honey as a wound dressing. *Wound Practice and Research*. 2011. 19, 204-220.
- (77) BARUI, A., MANDAL, N., MAJUMDER, S., DAS, R. K., SENGUPTA, S., BANERJEE, P., RAY, A. K., ROYCHAUDHURI, C, CHATTERJEE, J. Assessment of molecular events during in vitro re-epithelialization under honey-alginate matrix ambience. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*. 2013. 33, 3418-3425.
- (78) JASTRZEBSKA-STOJKO, Z., STOJKO, R., RZEPECKA-STOJKO, A., KABALADZIK, A., STOJKO, J. Biological activity of propolis honey balm in the treatment of experimentally-evoked burn wounds. *Molecules*. 2013. 18, 14397-14413.

- (79) KAMARATOS, A. V., TZIROGIANNIS, K. N., IRAKLIANOU, S. A., PANOUTSOPOULOS, G. I., KANELLOS, I. E., MELIDONIS, A. I. Manuka honey-impregnated dressings in the treatment of neuropathic diabetic foot ulcers. *International Wound Journal*. 2014. 11, 259-263.
- (80) MAJTAN, J., KUMAR, P., MAJTAN, T., WALLS, A. F., KLAUDINY, J. Effect of honey and its major royal jelly protein 1 on cytokine and MMP-9 mRNA transcripts in human keratinocytes. *Experimental Dermatology*. 2010. 19, 73-79.
- (81) BURLANDO, B., CORNARA, L. Honey in dermatology and skin care: a review. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2013. 12, 306-313.
- (82) WITTE, M. B., BARBUL, A. Role of nitric oxide in wound repair. *The American Journal of Surgery*. 2002. 183, 406-412.
- (83) KASSIM, M., ACHOUI, M., MANSOR, M., YUSOFF, K. M. The inhibitory effects of Gelam honey and its extracts on nitric oxide and prostaglandin E (2) in inflammatory tissues. *Fitoterapia*. 2010. 81, 1196-1201.
- (84) LUO, J. D., CHEN, A. F. Nitric oxide: a newly discovered function on wound healing. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2005. 26, 259-264.
- (85) LOWE, A., BILLS, J., VERMA, R., LAVERY, L., DAVIS, K., BALKUS JR, K. J. Electrospun nitric oxide releasing bandage with enhanced wound healing. *Acta Biomaterialia*. 2015. 13, 121-130.
- (86) BRISBOIS, E. J., BAYLISS, J., WU, J., MAJOR, T. C., XI, C., WANG, S. C., BARTLETT, R. H., HANDA, H., MEYERHOFF, M. E. Optimized polymeric film-based nitric oxide delivery inhibits bacterial growth in a mouse burn wound model. *Acta Biomaterialia*. 2014. 10, 4136-4142.
- (87) AL-WAILI, N. S. Identification of nitric oxide metabolites in various honeys: effects of intravenous honey on plasma and urinary nitric oxide metabolites concentrations. *Journal of Medicinal Food*. 2003. 6, 359-364.
- (88) HUSSEIN, S. Z., MOHD YUSOFF, K., MAKPOL, S., MOHD YUSOF, Y. A. Gelam honey inhibits the production of proinflammatory mediators NO, PGE (2), TNF-a, and IL-6 in carrageenan-induced acute paw edema in rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012. 2012, 1-13.
- (89) AL-WAILI, N. S., BONI, N. S. Natural honey lowers plasma prostaglandin concentrations in normal individuals. *Journal of Medicinal Food*. 2003. 6, 129-133.

- (90) VALLIANOU, N. G., GOUNARI, P., SKOURTIS, A., PANAGOS, J., KAZAZIS, C. Honey and its anti-inflammatory, anti-bacterial and antioxidant properties. *General Medicine*. 2014. 2, 132.
- (91) AL-WAILI, N. S., HAQ, A. Effect of honey on antibody production against thymus-dependent and thymus-independent antigens in primary and secondary immune responses. *Journal of Medicinal Food*. 2004. 7, 491-494.
- (92) BOGDANOV, S., JURENDIC, T., SIEBER, R., GALLMANN, P. Honey for nutrition and health: A review. *Journal of American College of Nutrition*. 2008. 27, 677-689.
- (93) NAYIK, G. A., NANDA, V. Characterization of the volatile profile of unifloral honey from Kashmir of India by using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *European Food Research and Technology*. 2015. 240, 1091-1100.
- (94) HENATSCH, D., WESSELING, F., KROSS, K. W., STOKROOS, R. J. Honey and beehive products in otorhinolaryngology: a narrative review. *Clinical Otolaryngology*. 2016. 41, 519-531.
- (95) BUBA, F., GIDADO, A., SHUGABA, A. Analysis of Biochemical Composition of Honey Samples from North-East Nigeria. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*. 2013, 2, 1-5.
- (96) VARZAKAS, T., LABROPOULOS, A., ANESTIS, SWEETENERS, S. *Nutritional Aspects, Applications, and Production Technology*. London: CRC Press, 2012. ISBN: 9781439876732
- (97) SUDAN, P., KAUR, R., SHARMA, S., JAIN, U. K. A critical review on natural and artificial sweeteners. *The Pharmaceutical and Chemical Journal*. 2016. 3, 21-29.
- (98) OHMENHAEUSER, M., MONAKHOVA, Y. B., KUBALLA, T., LACHENMEIER, D. W. Qualitative and Quantitative Control of Honeys Using NMR Spectroscopy and Chemometrics. *Analytical Chemistry*. 2013. 2013, 1–9.
- (99) IGLESIAS, M., DE LORENZO, C., POLO, M., MARTIN-ALVEREZ, P., PUEYO, E. Usefulness of amino acid composition to discriminate between honeydew and floral honeys. Application to honeys from a small geographic area. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004. 52, 84-89.
- (100) PITA-CALVO, C., VAZQUEZ, M. Differences between honeydew and blossom honeys: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 2017. 59, 79-87.
- (101) ESCRICHE, I., KADAR, M., JUAN-BORRÁS, M., DOMENECH, E. Suitability of antioxidant capacity, flavonoids and phenolic acids for floral authentication of honey. Impact of industrial thermal treatment. *Food Chemistry*, 2014. 142, 135–143.

- (102) KAHOUN, D., REZKOVÁ, S., VESKRNOVÁ, K., KRÁLOVSKÝ, J., HOLČAPEK, M. Determination of phenolic compounds and hydroxymethylfurfural in meads using high performance liquid chromatography with coulometric–array and UV detection. *Journal of Chromatography A*. 2008. 1202, 19-33.
- (103) FALLICO, B., ARENA, E., ZAPPALA, M. Degradation of 5-hydroxymethylfurfural in honey. *Journal of Food Science*. 2008. 73, 625-631.
- (104) ARENA, E., BALLISTRERI, G., FALLICO, B. Kinetics of 3-deoxy-D-erythro-hexos-2-ulose in unifloral honeys. *Journal of Food Science*. 2011. 76, 1044-1049.
- (105) EREJUWA, O., SULAIMAN, S., WAHAB, M. Oligosaccharides might contribute to the antidiabetic effect of honey: A review of the literature. *Molecules*. 2012. 17, 248-266.
- (106) ABRAHAM, K., GÜRTLER, R., BERG, K., HEINEMEYER, G., LAMPEN, A., APPEL, K. E. Toxicology and risk assessment of 5-Hydroxymethylfurfural in food. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2011. 55, 667-678.
- (107) FEÁS, X., PIRES, J., ESTEVINHO, M. L., IGLESIAS, A., ARAUJO, J. P. P. Palynological and physicochemical data characterisation of honeys produced in the Entre-Douro e Minho region of Portugal. *International Journal of Food Science & Technology*. 2010. 45, 1255-1262.
- (108) IGLESIAS, A., PASCOAL, A., CHOUPINA, A. B., CARVALHO, A. A., FEÁS, X., ESTEVINHO, L. M. Developments in the Fermentation Process and Quality Improvement Strategies for Mead Production. *Molecules*. 2014. 19, 12577-12590.
- (109) PEREIRA, A. P., DIAS, T., ANDRADE, J., RAMALHOSA, E., ESTEVINHO, L. M. Mead production: Selection and characterization assays of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food and Chemical Toxicology*. 2009. 47, 2057-2063.
- (110) PEREIRA, A. P., MENDES-FERREIRA, A., OLIVEIRA, J. M., ESTEVINHO, L. M., MENDES-FAIA, A. High-cell-density fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* for the optimisation of mead production. *Food Microbiology*. 2013. 33, 114-123.
- (111) GUPTA, J., SHARMA, R. Production technology and quality characteristics of mead and fruit-honey wines: A review. *Natural Product Radiance*. 2009. 8, 345-355.
- (112) ČERMÁKOVÁ T., CHLEBO, R., HUSÁRIKOVÁ M. *Kniha o medu: Historie, léčitelství, kosmetika, gastronomie, tradice, produkty*. Bratislava: Eastone Books, 2010. ISBN: 9788081091322.
- (113) KAHOUN, D., ŘEZKOVÁ, S., KRÁLOVSKÝ, J. Effect of heat treatment and storage conditions on mead composition. *Food Chemistry*. 2017. 219, 357-363.

- (114) RAMALHOSA, E., GOMES, T., PEREIRA, A. P., DIAS, T., ESTEVINHO, L. M. Mead production: Tradition versus modernity. *Advances in Food and Nutrition Research*. 2011. 63, 101-118.
- (115) DIGBY, K. *The Closet of the Eminently Learned Sir Kenelme Digbie Opened*. London: Prospect Books. 2010. ISBN: 978-1903018705.
- (116) MULLAN, W. M. A. *Starter Cultures Importance of Selected Genera*. In *Encyclopedia of Food Microbiology*, Oxford: Academic Press. 2014. 515-521. ISBN: 978012384733.
- (117) CHEN, C. H., WU, Y. L., LO, D., WU, M. C. Physicochemical property changes during the fermentation of longan (*Dimocarpus longan*) mead and its aroma composition using multiple yeast inoculations. *Journal of the Institute Brewing*. 2013. 119, 303-308.
- (118) JACKOWETZ, J. N., DIERSCHKE, S., MIRA DE ORDUÑA, R. Multifactorial analysis of acetaldehyde kinetics during alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Research International*. 2011. 44, 310-316.
- (119) SROKA, P., TUSZYŃSKI, T. Changes in organic acid contents during mead wort fermentation. *Food Chemistry*. 2007. 104, 1250-1257.
- (120) IURLINA, M. O., FRITZ, R. Characterization of microorganisms in Argentinean honeys from different sources. *International Journal of Food Microbiology*. 2005. 105, 297-304.
- (121) EREJUWA, O., SULAIMAN, S., WAHAB, M. Honey: A novel antioxidant. *Molecules* 2012. 17, 4400-4423.
- (122) FEÁS, X.; IGLESIAS, A.; RODRIGUES, S.; ESTEVINHO, L. Effect of erica sp. honey against microorganisms of clinical importance: Study of the factors underlying this biological activity. *Molecules*. 2013. 18, 4233-4246.
- (123) MCCONNELL, D., SCHRAMM, K. Mead success: Ingredients, processes and techniques. *Zymurgy Spring*. 1995. 4, 33-39.
- (124) UKPABI, U. J. Quality evaluation of meads produced with cassava (*Manihot esculenta*) floral honey under farm conditions in Nigeria. *Tropical and Subtropical Agroecosystem*. 2006. 6, 37-41.
- (125) PEREIRA, A. P., MENDES-FERREIRA, A., ESTEVINHO, L. M., MENDES-FAIA, A. Mead's production: Fermentative performance of yeasts entrapped in different concentrations of alginate. *Journal of the Institute Brewing*. 2014. 120, 575-580.

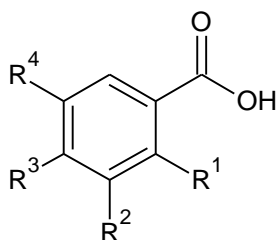
- (126) PEREIRA, A. P., MENDES-FERREIRA, A., OLIVEIRA, J. M., ESTEVINHO, L. M., MENDES-FAIA, A. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilisation on mead production. *LWT-Food Science and Technology*. 2014. 56, 21-30.
- (127) GOMES, T., BARRADAS, C., DIAS, T., VERDIAL, J., MORAIS, J. S., RAMALHOSA, E., ESTEVINHO, L. M. Optimization of mead production using response surface methodology. *Food and Chemical Toxicology*. 2013. 59, 680–686.
- (128) ŠMOGROVICOVÁ, D., NÁDASKÝ, P., TANDLICH, R., WILHELMI, B. S., CAMBRAY, G. Analytical and aroma profiles of slovak and south african meads. *Czech Journal of Food Sciences*. 2012. 30, 241–246.
- (129) NOVÁKOVÁ, L., DOUŠA, M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Praha: Lucie Nováková, Michal Douša, 2013. ISBN: 978-80-260-4243-3.
- (130) CHURÁČEK, J. *Analytická separace látek*. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1990. ISBN: 80-03-00569-8.
- (131) HOLČAPEK, M. Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS). Pardubice: Univerzita Pardubice, 2001.
- (132) <http://laboratoryinfo.com/hplc> [cit. 2017-03-28]
- (133) <http://www.hplc.cz/> [cit. 2017-03-28]
- (134) SNYDER, L. R., KIRKLAND, J., DOLAN, J.W. *Introduction to modern liquid chromatography*. Hoboken: John Wiley & Sons, 2010. ISBN: 978-0-470-16754-0.
- (135) <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/cd/hypertext/AJALB.htm> [cit. 2017-03-28]
- (136) OLŠOVSKÁ, J., JURKOVÁ, M. Nové trendy v kapalinové chromatografii a jejich využití v analýze piva a pivovarských surovin. Část 1. Teoretický úvod. *Kvasný průmysl* 58. 2012. 30-35.
- (137) http://cesmina.vscht.cz/trp/cz/hplc_57 [cit. 2017-03-28]
- (138) VIDOVÁ, V., LEMR, K., HAVLÍČEK, V. Současné trendy hmotnostní spektrometrie. *Chemické Listy*. 2008. 102, 957-959.
- (139) HOLČAPEK, M. Hmotnostní spektrometrie [online], Mass spektrometry group, Univerzita Pardubice, [cit. 30.3.2017]
- (140) <http://ach.upol.cz/user-files/intranet/10-im-ms-1352292974.pdf> [cit. 30.3.2017]
- (141) <http://slideplayer.cz/slide/2523025/> [cit. 30.3.2017]
- (142) FRIEDECKÝ, D., LEMR, K. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2012. 20, 152-157.

- (143) BIESAGA, M., PYRZYNSKA, K. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry studies of the phenolic compounds in honey. *Journal of Chromatography A*. 2009. 1216, 6620-6626.
- (144) DAS, A.; DATTA, S.; MUKHERJEE, S.; BOSE, S.; GHOSH, S.; DHAR., P. Evaluation of antioxidative, antibacterial and probiotic growth stimulatory activities of *Sesamum indicum* honey containing phenolic compounds and lignans. *Food Science and Technology*. 2015. 61, 244-250.
- (145) LIU, H., ZHANG, M., GUO, Y., QIU, H. Solid-phase extraction of flavonoids in honey samples using carbamate-embedded triacetyl-modified silica sorbent. *Food Chemistry*. 2016. 204, 56-61.
- (146) MICHALKIEWICZ, A., BIESAGA, M., PYRZYNSKA, K. Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey. *Journal of Chromatography A*. 2008. 1187, 18-24.
- (147) HABIB, H. M., AL MEQBALI, F. T., KAMAL, H., SOUKA, U. D., IBRAHIM, W. H. Bioactive components, antioxidant and DNA damage inhibitory activities of honeys from arid regions. *Food Chemistry*. 2014. 153, 28-34.
- (148) YAO, L., JIANG, Y., SINGANUSONG, R., D'ARCY, B., DATTA, N., CAFFIN, N., RAYMONT, K. Flavonoids in Australian *Melaleuca*, *Guioa*, *Lophostemon*, *Banksia* and *Helianthus* honeys and their potential for floral authentication. *Food Research International*. 2004. 37, 166-174.
- (149) YAO, L., DATTA, N., TOMÁS-BARBERÁN, F. A., FERRERES, F., MARTOS, I., SINGANUSONG, R., Flavonoids, phenolic acids and abscisic acid in Australian and New Zealand *Leptospermum* honeys. *Food Chemistry*. 2003. 81, 159-168.
- (150) DA SILVA, I. A. A., DA SILVA, T. M. S., CAMARA, C. A., QUEIROZ, N., MAGNANI, M., DE NOVAIS, J. S., SOLEDADE, L. E. B., LIMA, E. O., DE SOUZA, A. L., DE SOUZA, A. G. Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. *Food Chemistry*, 2013. 141, 3552-3558.
- (151) SARMENTO SILVA, T. M.; PEREIRA DOS SANTOS, F.; EVANGELISTA-RODRIGUES, A.; SARMENTO DA SILVA, E. M.; SARMENTO DA SILVA, G.; SANTOS DE NOVAIS, J.; RIBEIRO DOS SANTOS, F. A.; AMORIM CAMARA, C. Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaíra (*Melipona subnitida*) honey. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2013. 29, 10-8.

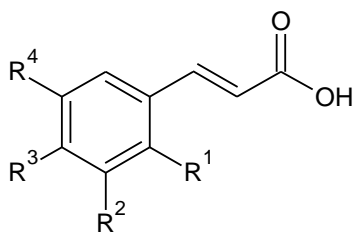
PŘÍLOHY

Obrázky

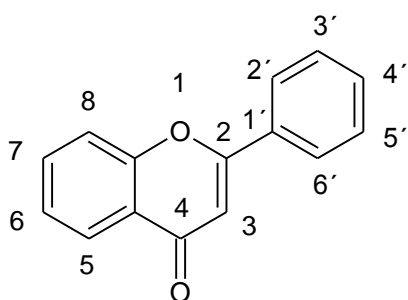
Obrázek P1: Struktury standardů fenolických látek.



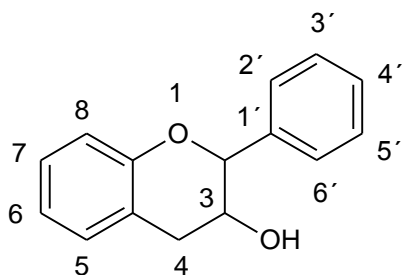
K. 4-hydroxybenzoová	$R_2=R_3=OH$
K. syringová	$R_2=R_4=OCH_3, R_3=OH$
K. galová	$R_2=R_3=R_4=OH$
K. 3,4-hydroxybenzoová	$R_3=OH$
K. gentisová	$R_1=R_4=OH$
K. vanilová	$R_2=OCH_3, R_3=OH$



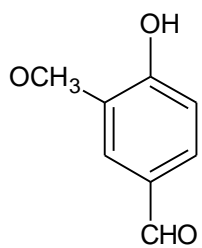
K. p-kumarová	$R_3=OH$
K. m-kumarová	$R_4=OH$
K. kávová	$R_2=R_3$
K. ferulová	$R_2=OCH_3, R_3=OH$
K. isoferulová	$R_2=OH, R_3=OCH_3$



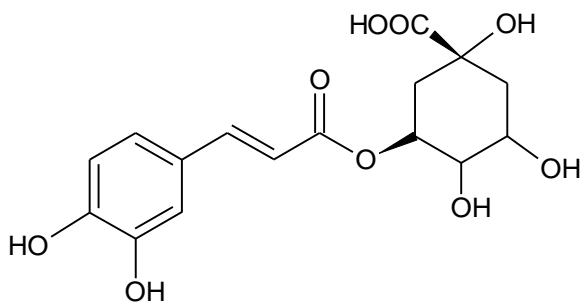
Kvercetin	$3, 5, 7, 3', 4'=OH$
Myricetin	$3, 5, 7, 3', 4', 5'=OH$
Apigenin	$5, 7, 4'=OH$
Luteolin	$5, 7, 3', 4' =OH$
Taxifolin	$3, 5, 7, 4', 5'=OH$



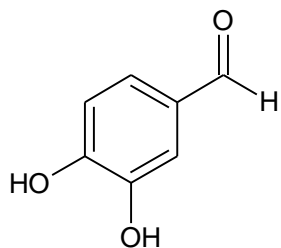
Katechin	$3, 5, 7, 4', 5'=OH$
Epikatechin	$5, 7, 3', 4', 5'=OH$



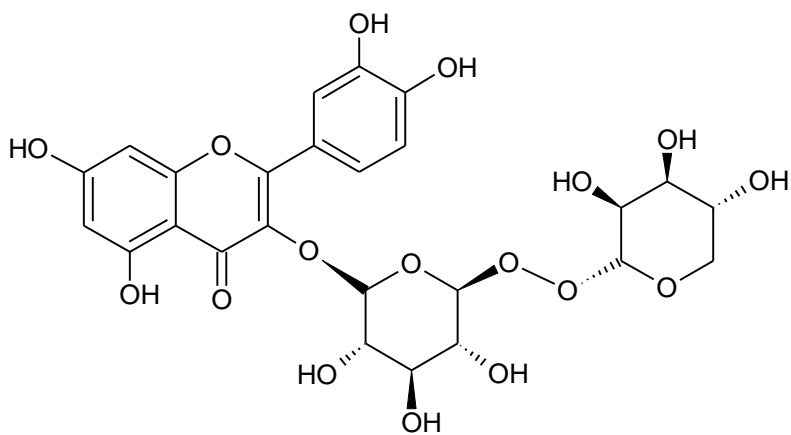
Vanilin



Chlorogenová kyselina



3,4-dihydroxybenzaldehyd



Rutin

Tabulky

Tabulka P1: Kalibrační tabulka závislostí výšky píků jednotlivých látek a jejich koncentraci.

	Koncentrace (µg/ml)									
	0,01	0,1	0,25	0,5	0,75	1,0	1,5	2	2,5	5
3,4-DHBA	3183	30885	78422	143927	205478	270704	389788	490322	604614	1006802
	3151	30910	79525	143368	204726	270904	386556	490322	603726	1006828
4-HBA	13092	98238	246914	495470	683241	897905	1296940	1602290	1880830	3890508
	12935	92005	249605	487060	682349	898591	1298020	1602640	1881130	3823570
Chlorogenová kyselina	4475	35736	90854	178598	281000	357342	525442	779925	1033490	1424063
	4526	33391	90950	179146	283000	357095	595160	756618	1032770	1604360
Syringová kyselina	255	745	1507	3671	5236	6136	10262	13823	20618	30381
	224	738	1482	3655	5246	6132	11268	13815	20696	32320
Rutin	2487	22775	60568	114126	180000	231487	375775	529128	655528	1115667
	2834	22753	59723	122787	183000	231407	375600	529835	654886	1137443
Kávová kyselina	27180	234804	616782	1263207	1860000	2473690	3846180	5555520	6734220	10894890
	25076	231837	628504	1225703	1840000	2478690	4294220	5550220	6729400	10727932
Ferulová kyselina	1173	7123	18764	38584	55600	74750	117590	164580	216638	374939
	1191	7309	19652	37140	55800	74646	121411	164761	216879	352414
Taxifolin	4257	38956	100870	194692	297000	388654	589250	813557	966001	1760656
	4198	38874	103236	201876	291000	389023	585109	813146	965957	1818009
Epikatechin	1992	10371	26347	55834	85100	114499	188749	257730	316591	554909
	1126	10120	26824	53012	84600	115449	216426	257347	316137	553445

	Koncentrace (µg/ml)									
	0,002	0,02	0,05	0,1	0,15	0,2	0,3	0,4	0,5	1
Galová kyselina	0	4456	22924	54859	89079	132935	202969	288208	366830	684749
	0	4274	23687	56221	89201	132966	203782	288094	366562	688624
3,4-DHB	3679	32873	87264	171554	250117	327742	506138	705223	865013	1681925
	3659	35181	90858	168912	251050	327191	509949	705953	865697	1677400
Vanilin	0	1737	4038	9008	12655	17376	26320	34726	43203	88417
	0	1894	4000	9061	12879	17458	26586	34441	43245	88255
Vanilová kyselina	0	498	721	1000	1293	1657	2235	2857	3627	6583
	0	504	721	1034	1291	1563	2227	2844	3625	6853
Myricetin	73	116	314	616	1323	9195	4845	59918	80688	495512
	70	124	311	613	1328	9207	4866	60092	80719	475187
Katechin	908	1574	4912	9291	14900	18908	30699	42378	50200	97552
	966	1582	5252	10426	14400	18924	31475	42396	50496	101713
Isoferulová kyselina	0	1193	3548	6645	10135	13372	20026	27503	35328	71852
	0	1197	3546	6644	10163	13315	20133	27516	35357	71713
p-kumarová kyselina	5038	40907	106795	212982	319000	398946	663995	937290	1206660	1957356
	5195	39971	109611	205661	305000	400100	668699	937165	1204620	1943673
m-kumarová kyselina	5038	40907	106795	212982	319000	398946	663995	475670	627977	1074647
	5195	39971	109611	205661	305000	400100	668699	475645	627697	1026852
Salicylová kyselina	24292	281368	541094	986198	1400000	1976827	3131010	4343120	5318180	8240658
	24313	243369	578559	979417	1420000	1954291	3312980	4342600	5315960	8518600
Kvecetin	2088	1923	17134	46203	129595	232015	3131010	582095	728740	1307215
	1921	2092	17062	48745	128054	231561	3312980	581540	728766	1313016
Luteolin	717	5609	15510	30092	43900	60777	402895	133436	165655	359527
	620	5370	15305	29817	45200	60611	409091	133723	165209	361367
Apigenin	17945	52290	131768	237350	345000	453172	663229	889572	1107800	1788394
	16695	53563	131467	246223	346000	461671	679177	889943	1118350	1789208

	Koncentrace (ng/ml)									
	0,1	1	2,5	5	7,5	10	15	20	25	50
Gentisová kyselina	431	1366	4298	9165	15885	21331	35448	50180	64895	113748
	411	1364	4072	9024	15674	22044	35732	50124	64777	113748