

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DISERTAČNÍ PRÁCE

2024

Ing. Kateřina Pravcová

UNIVERZITA PARDUBICE
Fakulta chemicko-technologická
Katedra analytické chemie

**ANALÝZA PŘÍRODNÍCH ANTIOXIDANTŮ
V POTRAVINÁCH A POTRAVINOVÝCH
SUROVINÁCH S VYUŽITÍM MODERNÍCH
ANALYTICKÝCH METOD**

Kateřina Pravcová

DISERTAČNÍ PRÁCE

2024

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

Ing. Kateřina Pravcová

Poděkování:

Chtěla poděkovat doc. Ing. Lence Česlové, Ph.D. za její čas, obětavost, trpělivost, vstřícný přístup, cenné rady a odborné, profesionální vedené během celé naší spolupráce.

Dále bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za jejich podporu při studiu.

ANOTACE

Disertační práce se věnuje vývoji analytických metod pro stanovení vybraných biologicky aktivních látek v potravinách a potravinových surovinách. Pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií byl objasněn fenolický profil v medovinách a pseudobilovinách. Ve vzorcích medovin a medu, enviromentálních vodách a ovoci byl navíc stanoven obsah pesticidů.

KLÍČOVÁ SLOVA

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

TITLE

Development of modern analytical methods for analysis of biologically active compounds in food and food raw materials

ANNOTATION

The dissertation deals with the development of analytical methods for the determination of selected biologically active compounds in foods and food raw materials. The phenolic profile in mead and pseudocereals was elucidated by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. In addition, the content of pesticides was determined in samples of mead and honey, environmental waters and fruits.

KEYWORDS

Phenolic compounds, pesticides, antioxidant activity, meads, pseudocereals, liquid chromatography, mass spektrometry, extraction

OBSAH

1	<i>ANALÝZA MEDOVIN A PSEUDOObILOVIN</i>	16
1.1	ANTIOXIDANTY A FENOLICKÉ LÁTKY	16
1.1.1	Fenolické kyseliny	17
1.1.2	Flavonoidy	19
1.1.3	Spektrofotometrické metody pro stanovení fenolických sloučenin	22
1.1.4	Extrakce	25
1.1.5	Hydrolyza	26
1.1.6	Kapalinová chromatografie	27
1.2	MED	29
1.2.1	Základní charakteristika a složení medu	29
1.2.2	Vlastnosti a využití medu	29
1.2.3	Klasifikace medu	30
1.2.4	Výroba medu	30
1.2.5	Kvalita a autenticita medu	31
1.3	MEDOVINA	32
1.3.1	Základní charakteristika a klasifikace medovin	32
1.3.2	Výroba medovin	32
1.4	PSEUDOObILOVINY	35
1.4.1	Pohanka	35
1.4.2	Amarant	36
1.5	STANOVENÍ FENOLICKÝCH LÁTEK V PŘÍRODNÍCH MATRICÍCH	38
1.5.1	Úprava a extrakce vzorku	38
1.5.2	Analýza fenolických látek	39
1.6	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	41
1.6.1	Medoviny	41
1.6.2	Pohanka	44
1.6.3	Amarant	47
1.7	VÝSLEDKY A DISKUSE	54
1.7.1	Medoviny	54
1.7.2	Pohanka	61
1.7.3	Amarant	68
1.8	ZÁVĚR	78
1.9	LITERATURA	80
2	<i>STANOVENÍ PESTICIDŮ VE VODÁCH, MEDU, MEDOVINÁCH A V OVOCI</i>	100
2.1	PESTICIDY	100
2.1.1	Klasifikace pesticidů	100
2.1.2	Izolace pesticidů	109
2.1.3	Pesticidy v životním prostředí	109
2.1.4	Pesticidy v medu a ovlivnění včel	110
2.1.5	Stanovení pesticidů ve vodě a v biologických matricích (med, medoviny a ovoce)	110

2.2	MOF	112
2.2.1	Složení MOF	112
2.2.2	Syntéza MOF	112
2.2.3	Klasifikace MOF	112
2.3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	114
2.3.1	Neonikotinoidy ve vodách	114
2.3.2	Pesticidy v medu	116
2.3.3	Fenhexamid v ovoci	118
2.4	VÝSLEDKY A DISKUSE	120
2.4.1	Neonikotinoidy ve vodách	120
2.4.2	Pesticidy v medu	124
2.4.3	Fenhexamid v ovoci	127
2.5	ZÁVĚR	129
2.6	LITERATURA	130
	<i>PUBLIKAČNÍ ČINNOST</i>	<i>143</i>

SEZNAM OBRÁZKŮ:

Obrázek 1: Mechanismus antioxidační aktivity fenolů.....	17
Obrázek 2: Zástupci fenolických kyselin odvozených od kyseliny benzoové.....	18
Obrázek 3: Zástupci fenolických kyselin odvozených od kyseliny skořicové.	18
Obrázek 4: Základní struktura flavanoidu.	19
Obrázek 5: Základní struktura flavanolu.	20
Obrázek 6: Základní struktura flavonolu.	20
Obrázek 7: Základní struktura flavanonu.....	21
Obrázek 8: Základní struktura flavonu.	21
Obrázek 9: Základní struktura antokyanu.	22
Obrázek 10: Základní struktura antokyanidinu.....	22
Obrázek 11: Struktura ABTS.....	23
Obrázek 12: Struktura radikálu DPPH.....	24
Obrázek 13: Základní struktura HMF.....	31
Obrázek 14: Základní schéma moderní výroby medoviny.	33
Obrázek 15: Postupná extrakce volných a vázaných fenolických kyselin.....	51
Obrázek 16: Optimalizovaná chromatografická separace monitorovaných standardů.....	55
Obrázek 17: Chromatografická separace fenolických látek obsažených v extraktech ze vzorku medoviny č. 9.	58
Obrázek 18: Chromatografická separace fenolických látek obsažených v extraktech ze vzorku medoviny č. 15.	58
Obrázek 19: Sutinový graf	60
Obrázek 20: PCAS.....	61
Obrázek 21: Antioxidační kapacita vzorku Kroupa a vliv klíčení.....	66
Obrázek 22: Antioxidační kapacita vzorku Lámanka a vliv klíčení.....	66
Obrázek 23: Celkový obsah fenolických látek sledovaný u pohanky.	67
Obrázek 24: Optimalizovaná separace standardů amarantu.	70
Obrázek 25: Chromatografická separace látek obsažených v extraktu E3.	72
Obrázek 26: Chromatografická separace vázaných fenolických látek po hydrolýze.	73
Obrázek 27: Antioxidační aktivita fenolických látek amarantových zrn.....	75
Obrázek 28: Celkové množství fenolických látek různých extraktů amarantových zrn.....	77
Obrázek 29: Závislost mezi celkovým množstvím fenolických látek.....	77
Obrázek 30: Struktura imidaklopridu.....	102

Obrázek 31: Struktura acetamipridu.....	102
Obrázek 32: Struktura thiaklopridu.....	103
Obrázek 33: Struktura thimethoxanu.....	104
Obrázek 34: Struktura klothianidinu.....	104
Obrázek 35: Struktura deltamethrinu.....	105
Obrázek 36: Struktura T-fluvalinátu.....	106
Obrázek 37: Struktura karbendazimu.....	107
Obrázek 38: Struktura epoxykonazolu.....	107
Obrázek 39: Struktura metconazolu.....	108
Obrázek 40: Struktura prochlorazu.....	108
Obrázek 41: Struktura fenhexamidu.....	109
Obrázek 42: Krystalická struktura ZIF-8.....	113
Obrázek 45: HPLC-DAD chromatogram neonikotinoidů při 270 nm ve vodě.....	120
Obrázek 46: Účinnost extrakce neonikotinoidů pomocí různých sorbentů.....	123
Obrázek 47: Optimalizovaná HPLC separace vybraných pesticidů.....	124
Obrázek 48: RP-HPLC chromatogram červeného vinných hroznů.....	128

SEZNAM TABULEK:

Tabulka 1: Vzorky medovin.	42
Tabulka 2: Gradientová eluce pro separaci medovin.	44
Tabulka 3: Gradientová eluce pro separaci pohanky.	46
Tabulka 4: Souhrn jednotlivých provedených extrakcí.	49
Tabulka 5: Gradientová eluce pro separaci amarantu.	52
Tabulka 6: Optimalizované parametry pro MS/MS analýzu medovin.	54
Tabulka 7: Regresní parametry, meze detekce a meze stanovitelnosti pro fenolické látky....	56
Tabulka 8: Optimalizované parametry pro MS/MS analýzu pohanky.	62
Tabulka 9: Regresní parametry pro jednotlivé fenolické látky v pohance.	63
Tabulka 10: Kvantifikace vybraných fenolických látek v pohance na příslušné standardy...	64
Tabulka 11: Množství vlhkosti během jednotlivých dní klíčení pohanky.	65
Tabulka 12: Optimalizované parametry pro MS/MS analýzu amarantu.	68
Tabulka 13: Regresní parametry pro jednotlivé fenolické látky obsažené v amarantu.	69
Tabulka 14: Kvantifikace fenolických látek na dostupné standardy.....	70
Tabulka 15: Vzorky medů.	116
Tabulka 16: Vzorky medovin od výrobců ze Slovenské a České republiky.	117
Tabulka 17: Meze detekce, směrnice, úsek, interval spolehlivosti a přesnost.....	121
Tabulka 18: Hodnoty návratnosti pro různé koncentrační hladiny studovaných.....	121
Tabulka 19: Směrnice, úsek a meze stanovitelnosti standardů v medu a medovinách.....	125
Tabulka 20: Koncentrace pesticidů ve vzorcích medu.	126
Tabulka 21: Koncentrace pesticidů ve vzorcích medovin.	127
Tabulka 22: Analýza obsahu fenhexamidu v komerčně dostupných bobulích.....	128

SEZNAM ZKRATEK:

5-HMF	5-hydroxymethylfurfural
AAPM	metoda s 4-aminoantipyrinem a aminofenazonem
ABTS	2,2'-azinobis-(3-ethylbenzo-thiazolin-6-sulfonát)
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric-pressure Chemical Ionization)
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Photoionization Ionization)
AuNP	nanočástice zlata (Gold Nanoparticles)
CE	kapilární elektroforéza (Capillary Electrophoresis)
DAD	detektor s diodovým polem (Diode Array Detector)
DLLME	disperzní mikroextrakce kapalina-kapalina (Dispersive Liquid-liquid Microextraction)
DPPH	2,2-difenyl-1-pikrazylhydrazyl
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EDX	energeticky disperzní rentgenová analýza (Energy Dispersive X-Ray Analysis)
ESI	ionizace elektrosprejem (ElectroSpray Ionization)
FCM	metoda s Folin-Ciocalteuovým činidlem (Folin-Ciocalteu method)
FAO	Organizace pro výživu a zemědělství (Food and Agriculture organization)
FNX	fenhexamid
FRAP	metoda založená na redukci železitých iontů (Feric Reducing Antioxidant Power)
GAE	ekvivalent kyseliny gallové (Gallic Acid Equivalent)
GAP	Správná zemědělská praxe (Good Agricultural Practice)
GC	plynová chromatografie (Gas Chromatography)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High-Performance Liquid Chromatography)
HPLC-MS	spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (Liquid Chromatography-mass Spectrometry)
ICP-MS	hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry)
LC	kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography)
LLE	extrakce kapalina-kapalina (Liquid-Liquid Extraction)

LOD	limit detekce (Limit of Detection)
LOQ	limit kvantifikace (Limit of Quantification)
LTQ	lineární iontová past (Linear Ion Trap)
MAE	extrakce v mikrovlnném poli (Microwave-Assisted Extraction)
MCWCNT	vícetěnné uhlíkové nanotrubky (Multi-walled Carbon Nanotubes)
MEPS	sorpční extrakce míchadlem (Micro Extraction By Packed Sorbent)
MRL	maximální limity reziduí (Maximum Residue Limits)
MOF	organokovové sítě (Metal Organic Frameworks)
MRM	monitorování více reakcí (Multiple Reaction Monitoring)
MS	hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometer)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie (Tandem Mass Spectrometry)
MSPE	extrakce na magnetické tuhé fázi (Magnetic Solid Phase Extraktion)
NMR	nukleární magnetická rezonance (Nuclear Magnetic Resonance)
ORAC	metoda založená na eliminaci kyslíkových radikálů (Oxygen Radical Absorbance Capacity)
PBM	metoda Price a Butlera (Price and Butler Method)
PCA	analýza hlavních komponent (Principle Component Analysis)
PCAS	rozptylový diagram komponentního skóre (Principle Component Score)
PCAW	graf komponentních vah (Principle Component Weight)
PCP	porézní koordinační polymery (Porous Coordination Polymers)
PLE	zrychlená extrakce rozpouštědlem (Pressurized Liquid Extraction)
PTFE	polytetrafluorethylen
QqTOF	spojení kvadrupólu s analyzátozem doby letu (Quadrupole-Quadrupole-Time-Of-Flight)
QqQ	trojitý kvadrupól (Triple Quadrupole)
QuEChERS	disperzní extrakce na pevné fázi (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe method)
RP-HPLC	kapalinová chromatografie v systémech s obrácenými fázemi (Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography)
SBSE	mikroextrakce pomocí plněného tuhého sorbentu (Stir Bar Sorptive Extraction)
SDME	mikroextrakce do jedné kapky rozpouštědla (Single Drop Microextraction)
SFE	extrakce nadkritickou tekutinou (Supercritical Fluid Extraction)
SLE	podporovaná extrakce kapalina-kapalina (Supported Liquid-liquid Extraction)
SPE	extrakce tuhými fázemi (Solid Phase Extraction)

SPME	mikroextrakce na pevné fázi (Solid Phase Microextraction)
TBHQ	terc-Butylhydrochinon
TCL	tenkovrstvá chromatografie (Thin-Layer chromatography)
TOF	analyzátor doby letu (Time Of flight Detector)
UE	extrakce podpořená ultrazvukem (Ultrasound Extraction)
UV	ultrafialová oblast spektra (UltraViolet spectrum)
UV/VIS	ultrafialová-viditelná oblast spektra (UltraViolet-VISible spectrum)
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)
XRD	rentgenová difrakční prášková analýza (X-ray diffraction analysis)

ÚVOD

Produkce potravinářských výrobků je ovlivněna především poptávkou a požadavky spotřebitelů. V posledních letech se zvýšil zájem především o tzv. superpotraviny, které se vyznačují vysokými nutričními a energetickými hodnotami (antioxidanty, enzymy, vláknina, minerály, vitamíny apod.). Mezi nejznámější superpotraviny patří borůvky, goji, česnek, pseudoobiloviny (pohanka a amarant), zázvor, kurkuma, spirulina, chia, med a mnoho dalších. Analýzou antioxidantů vybraných superpotravin (med, pohanka a amarant) se zabývá i část této disertační práce. Prodej těchto potravin zajišťují z velké části řetězce supermarketů, které neustále vyvíjejí tlak na výrobce kvůli snižování marže. Dále se zvyšují i náklady na dopravu či energetické zdroje. Z tohoto důvodu někteří výrobci záměrně snižují kvalitu potravin s cílem vyššího ekonomického zisku a v některých případech se jedná již o jejich falšování. Pro všechny subjekty zapojené do potravinářského průmyslu je tedy velice důležitá autenticita (původ a pravost) potravin, která se snaží zabránit nepoctivé konkurenci a následné destabilizaci trhu.

Mezi nejčastěji falšované potraviny se řadí med, alkoholické nápoje, obilné produkty, káva, mléčné výrobky, olej a ryby. Vyšší poptávka a pokles světové populace včel jsou příčinou zvyšujícího se výskytu falšovaných medů. Falšování může být přímé (ředění vodou nebo přímo přidaným cukrem a sirupy) nebo nepřímé (krmení včel průmyslovými cukry a sirupy). Za účelem vyšších obchodních zisků je med falšován různými levnějšími sladidly, jako je kukuřičný sirup s vysokým obsahem fruktózy, maltózový sirup, třtinový cukr a sirupy z řepného cukru. Pro odhalení falšování medu může jako jeden z parametrů sloužit fenolický profil. Touto problematikou se zabývá i jedna z částí této disertační práce. Kromě studia fenolického profilu medu a medovin se tato práce zaměřuje i na stanovení obsahu pesticidů, který může sloužit jako biomarker pro znečištění životního prostředí.

K odhalení falšování potravin se využívá a vyvíjí mnoho nových moderních technik, mezi které patří kapalinová chromatografie (HPLC), plynová chromatografie (GC) a jejich spojení s hmotnostní spektrometrií (MS), či další spektroskopické metody jako je infračervená spektrometrie (IR) a Ramanova nukleární magnetická rezonance (NMR).

CÍLE PRÁCE

- Stanovení profilu fenolických látek v pseudoobilovinách a medovinách pomocí HPLC-MS s využitím extrakčních systémů kapalina-kapalina nebo kapalina-pevná látka
- Porovnání obsahu fenolických látek ve vzorcích medovin
- Zhodnocení vlivu technologického postupu výroby a typu medu na obsah fenolických látek a antioxidační aktivitu v medovinách
- Posouzení kvality a autenticity vybraných vzorků medovin
- Porovnání obsahu fenolických látek ve vzorcích pohanky
- Zhodnocení vlivu klíčení a typu extrakčního činidla na obsah fenolických látek a antioxidační aktivitu v pseudoobilovinách
- Syntéza vhodného kompozitního materiálu pro extrakci neonicotinoidů, zhodnocení výhod tohoto materiálu a jeho možnosti rozšíření použití na další nanostruktury
- Stanovení vybraných pesticidů v medu a medovinách pomocí HPLC ve spojení s QuEChERS extrakcí
- Stanovení pesticidů ve vodách
- Stanovení fenhexamidu v ovoci

1 ANALÝZA MEDOVIN A PSEUDOObILOVIN

1.1 ANTIOXIDANTY A FENOLICKÉ LÁTKY

Antioxidanty jsou látky, které snižují pravděpodobnost vzniku kyslíkových radikálů, proto mají pozitivní účinky na lidské zdraví a mohou sloužit jako prevence proti vzniku různých onemocnění, jako je rakovina, záněty, vysoký krevní tlak, kardiovaskulární onemocnění, neurologické degenerace, stárnutí a mnoho dalších [3,4]. U některých látek s antioxidačními vlastnostmi byly prokázány i protizánětlivé vlastnosti.

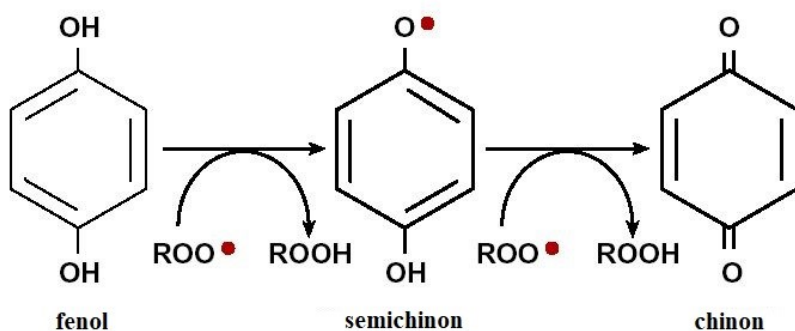
Antioxidanty se dělí se na přírodní a syntetické a pro svou schopnost omezit proces oxidace se mohou využívat jako konzervanty v potravinářském průmyslu. V současnosti je velkým trendem náhrada syntetických antioxidantů přírodními, a proto se často provádí jejich extrakce z rostlin a dalších přírodních zdrojů. Analýza látek s antioxidačními vlastnostmi se také často využívá pro monitorování kvality a nutričních hodnot potravin [1,2]. V posledních letech se značně zvýšil zájem o potraviny, které obsahují antioxidanty a jednou z významných skupin antioxidantů přítomných v potravinách jsou fenolické látky [5,6].

Fenolické látky jsou heterogenní sloučeniny, které se řadí do sekundárních metabolitů rostlin a mohou reagovat s volnými radikály. Vyskytují se především v rostlinách a zahrnují až 8000 známých struktur [7]. Mohou se skládat z poměrně jednoduchých molekul, jako jsou fenolické kyseliny nebo deriváty benzenu až po polymerizované sloučeniny, mezi něž se řadí například taniny, ligniny, antokyany, kumariny a trísloviny [8]. Obecně platí, že fenolické látky mohou být rozděleny podle jejich základní struktury do 10 hlavních skupin na jednoduché fenoly (například fenol, kresol, thymol a orcinol), fenolické kyseliny (například kyselina kávová, 3,4-dihydroxybenzoová, vanilová, kumarová, ferulová a sinapová), kumariny a isokumariny, naftochinony, xantony, stilbeny, antrachinony, flavonoidy a ligniny. Chemické a fyzikální vlastnosti fenolických látek mohou značně ovlivnit jejich extrakci i výběr metody pro jejich stanovení [9].

Fenolické látky mají alespoň jeden aromatický kruh, na kterém je navázána jedna nebo více hydroxylových skupin, které jsou vázány na alifatické nebo aromatické skelety. Významnou skupinou fenolických látek jsou především flavonoidy a fenolické kyseliny (deriváty kyseliny skořicové a benzoové) [4,10]. Fenolické kyseliny a flavonoidy se v potravinách vyskytují ve volné i vázané formě (estery, glykosidy atd). Přítomnost dalších takových navázaných sloučenin je zodpovědná za jejich specifickou charakteristiku a transport

v tělních tekutinách, ale nemá žádný významný vliv na biologickou aktivitu obsažených látek. Fenolické láky jsou důležité i pro kvalitu potravin rostlinného původu a zároveň hrají významnou roli při utváření organoleptických vlastností potravin a nápojů (barva, chuť a vůně) [8].

Fenolické látky mají různou biologickou aktivitu, ale jednou z velmi důležitých biologických vlastností je především jejich antioxidační aktivita, která je způsobena snižováním nebo eliminací volných radikálů kyslíku a dusíku v lidském těle. Antioxidant reaguje s reaktivním volným radikálem za vzniku nereaktivního radikálu antioxidantu. Tato reakce snižuje oxidační stres organismu. V případě fenolů reaguje radikál vodíku za vzniku stabilního chinonu (obrázek 1). Antioxidační účinnost v potravině závisí nejen na počtu a umístění hydroxylových skupin, ale také na dalších faktorech, jako je struktura molekul, stabilita, lipofilie/hydrofilie interakce s ostatními složkami potravin a na podmínkách prostředí (například pH). [11-13].



Obrázek 1: Mechanismus antioxidační aktivity fenolů [12].

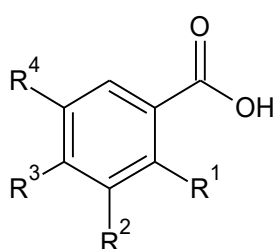
1.1.1 Fenolické kyseliny

Fenolické kyseliny jsou složeny z jednoho benzenového kruhu, na nějž jsou navázány hydroxylové a karboxylové skupiny. Tato skupina látek může být rozdělena podle jejich struktury na hydroxybenzoové a hydroxyskořicové kyseliny a tvoří přibližně jednu třetinu fenolů, které se vyskytují v rostlinách ve volné i vázané formě. Fenolické kyseliny mohou být vázány pomocí esterových, etherových nebo acetalových vazeb. Mezi hlavní zástupce hydroxybenzoových kyselin se řadí kyselina gallová, 4-hydroxybenzoová (4-HBA), 3,4-dihydroxybenzoová (3,4-DHB), vanilová a syringová. Mezi zástupce hydroxyskořicových

kyselin patří kyselina kávová, ferulová, *p*-kumarová a sinapová. Rozdíly mezi jejich deriváty spočívají v hydroxylaci a methoxylaci jejich aromatických kruhů [8,10].

Hydroxybenzoové kyseliny

Obecná struktura hydroxybenzoových kyselin je znázorněna na obrázku 2. Vyskytují se převážně ve vázané formě v podobě derivátů cukrů, ale mohou být i součástí složitých struktur, jako jsou hydrolyzované taniny a ligniny [14,15].

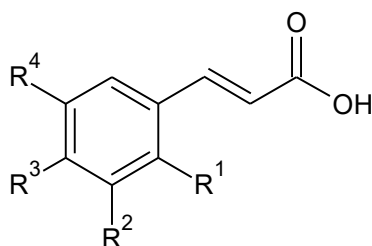


Kyselina	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
Galová	H	OH	OH	OH
Gentisová	OH	H	OH	H
4-hydroxybenzoová	H	H	OH	H
3,4-hydroxybenzoová	H	OH	OH	H
Salicylová	OH	H	H	H
Syringová	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Vanilová	H	OCH ₃	OH	H
Veratrová	H	OCH ₃	OCH ₃	H

Obrázek 2: Zástupci fenolických kyselin odvozených od kyseliny benzoové.

Hydroxyskořicové kyseliny

Struktura hydroxyskořicové kyseliny je uvedena na obrázku 3. Přítomnost těchto kyselin zaznamenáváme především v potravinách rostlinného původu, nejčastěji v ovoci. Hlavními zástupci této skupiny jsou kyselina, *p*-kumarová, kávová, ferulová a sinapová (obrázek 3). Hydroxyskořicové kyseliny jsou také přítomny převážně ve vázané formě. Vyskytují se často jako estery hydroxykyselin, jako je kyselina chinová, shikimová, vinná či jejich cukerné deriváty. Volné hydroxyskořicové kyseliny mohou být uvolněny pomocí chemické nebo enzymatické hydrolyzy během extrakce z přírodní matrice [14,16].



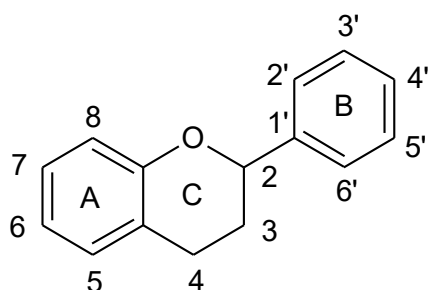
Kyselina	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
Ferulová	H	OCH ₃	OH	H
Kávová	H	OH	OH	H
<i>o</i> -kumarová	OH	H	H	H
<i>m</i> -kumarová	H	OH	H	H
<i>p</i> -kumarová	OH	H	OH	H
Sinapová	H	OCH ₃	OH	OCH ₃

Obrázek 3: Zástupci fenolických kyselin odvozených od kyseliny skořicové.

1.1.2 Flavonoidy

Flavonoidy se řadí mezi rostlinné fenoly, jejichž obecná struktura je znázorněna na obrázku 4. Skládá se ze dvou aromatických kruhů (kruh A a kruh B) spojených prostřednictvím tří uhlíkových můstků a kyslíkového heterocyklu (C kruh). Mají chelatační potenciál a vysoký oxidačně-redukční potenciál, který jim umožňuje působit jako redukční činidla, donory vodíku a zhášeče singletového kyslíku. Název je odvozen od latinského slova *flavus*, což znamená žlutý, jelikož flavonoidy poskytují rostlinám toto zbarvení. Mezi hlavní zástupce třídy flavonoidů patří antokyanidiny, chalkony, flavanoly, flavanony, flavony, flavonoly a isoflavony. Různorodost flavonoidů závisí na hydroxylaci pyronového kruhu, přítomnosti nebo nepřítomnosti dvojné vazby, počtu hydroxylových skupin v kruhu A a v kruhu B, anebo atomem kyslíku navázaným dvojnou vazbou k poloze 4 v kruhu C.

Flavonoidy se dělí na monomerní, dimerní a oligomerní. Polymerní flavonoidy, známé jako taniny, jsou rozděleny do dvou skupin: kondenzované a hydrolyzovatelné. Kondenzované taniny jsou polymery flavonoidů, zatímco hydrolyzovatelné taniny obsahují kyselinu gallovou. Výskyt přírodních flavonoidů je nejčastěji zaznamenán ve formě O-glykosidů. Flavonoidy jsou syntetizovány pouze pomocí rostlin, a proto rostlinné výrobky představují jejich významný zdroj v lidské stravě [17,18].

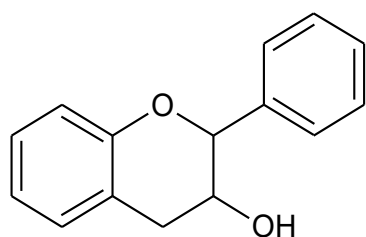


Obrázek 4: Základní struktura flavanoidu.

Flavanoly a flavonoly

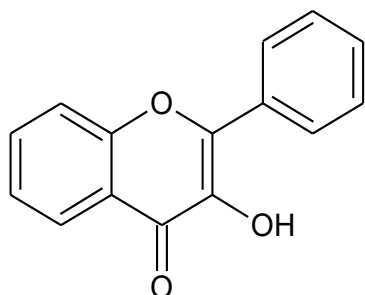
Flavanoly (katechiny) jsou známé také jako flavan-3-oly (obrázek 5) a patří mezi podskupinu proantokyanidinů, které mají hydroxylovou skupinu navázanou na uhlíkovém kruhu v poloze 3 a nemají kladný náboj na atomu kyslíku a dvojnou vazbu v kruhu C. Struktury flavanolů (obrázek 5) jsou velmi podobné flavonolům (obrázek 6). Kromě toho, že je atom kyslíku připojený pomocí dvojné vazby v poloze 4 na kruhu C, tak je i samotná dvojná vazba v kruhu C. Flavonoly mají antioxidační účinky a běžným zástupcem flavonolů je kvercetin

a kaempferol. Z flavanol glykosidů patří mezi významné zástupce rutin (glykosid kvercetin). Vyskytují se především v ovoci a zelenině [18].



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

Obrázek 5: Základní struktura flavanolu.

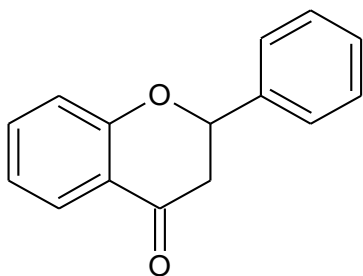


Pozice 5, 7, 4': OH → Kaempferol
 Pozice 5, 7, 3, 3', 4': OH → Kvercetin

Obrázek 6: Základní struktura flavonolu.

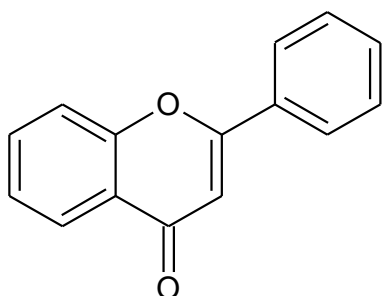
Flavanony a flavony

Flavanony (obrázek 7) a flavony (obrázek 8) mají struktury podobné flavanolům respektive flavonolům, ale liší se tím, že hydroxylová skupina již není vázána v poloze 3 na uhlíkovém kruhu. Flavony mají funkci přírodního inhibitoru, který zabraňuje vlivu škodlivých oxidačních změn v potravinách. Známý zástupce flavanonů je naringenin, který je tvořen chalkonsyntázou. Naringenin je nejčastější aglykon (látka bez cukerného zbytku) a vyskytuje se především v grapefruitu. Mezi další zástupce se řadí hesperetin, který je obsažen především v pomeranči a eriodiktyol, jehož hlavní výskyt je v citronu. Obecně nejčastější výskyt flavanonů a flavonů je zaznamenán v citrusových plodech, rajčatech a vybraných aromatických rostlinách [18].



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

Obrázek 7: Základní struktura flavanonu.

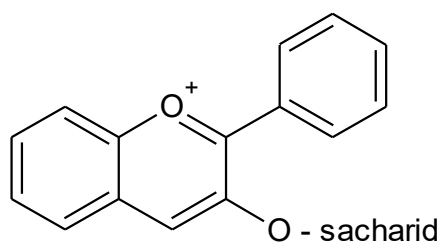


Pozice 5, 7, 4': OH → Apigenin
 Pozice 5, 7, 3', 4': OH → Luteolin

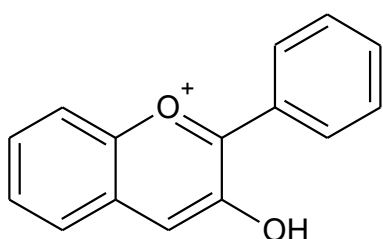
Obrázek 8: Základní struktura flavonu.

Antokyany a antokyanidiny

Antokyany (obrázek 9) jsou jedna z hlavních tříd flavanoidů, které jsou rozpustné ve vodě a jejichž barva se mění v závislosti na pH (červená, modrá a fialová zbarvení). Stabilita antokyanů může být ovlivněna chemickou strukturou, pH, světlem, teplotou skladování, koncentrací, přítomností enzymů, flavonoidů, proteinů a kovových iontů. Antokyany představují skupinu glykosylovaných antokyanidinů, kde cukerná složka je spojena s hydroxylem v poloze 3 antokyanidinové molekuly. V některých případech jsou cukerné složky acylovány kyselinou 4-hydroxybenzoovou, *p*-kumarovou, kávovou, ferulovou, sinapovou, octovou, šťavelovou, jablečnou nebo jantarovou. U antokyanidinů (obrázek 10) má atom kyslíku na uhlíkovém kruhu kladný náboj a dvě dvojně vazby v kruhu C. Antokyanidiny se vyskytují ve všech rostlinných tkáních včetně plodů [19].



Obrázek 9: Základní struktura antokyanu.



Pozice 5, 7, 4': OH → Pelargonidin
 Pozice 5, 7, 3', 4': OH → Kyanidin

Obrázek 10: Základní struktura antokyanidinu.

1.1.3 Spektrofotometrické metody pro stanovení fenolických látek

V oblasti chemické a biologické analýzy potravin existuje mnoho spektrofotometrických metod používaných pro stanovení celkového množství antioxidační kapacity fenolických látek. Metody jsou založeny na rozdílném principu a mohou být různě modifikovány [20]. Pro posouzení obsahu fenolických látek jsou nejčastěji využívány metody s Folin-Ciocalteuovým činidlem (FCM), metoda Price a Butlera (PBM) a metoda s 4-aminoantipyrinem a aminofenazonem (AAPM). Pro hodnocení antioxidační kapacity se používají metody založené na eliminaci radikálů, mezi které patří ABTS [2,2'-azinobis-(3-ethylbenzo-thiazolin-6-sulfonová kyselina)] nebo DPPH (difenyl-pikrylhydrazyl), dále metoda založená na eliminaci kyslíkových radikálů ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), metoda založená na redukci železitých iontů FRAP (Feric Reducing Antioxidant Power) a mnoho dalších [21].

Stanovení celkového obsahu fenolických látek

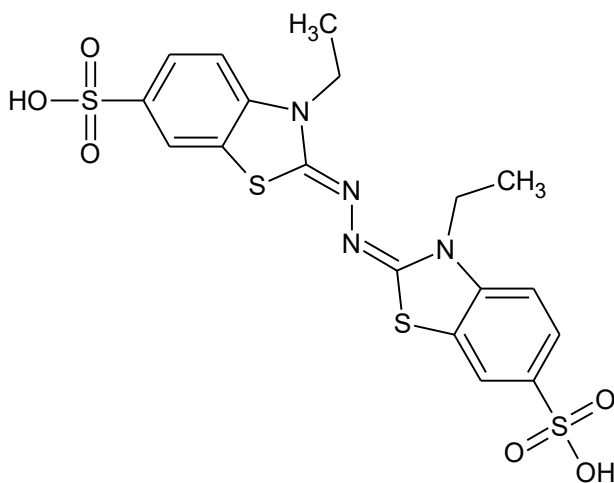
Mezi dvě hlavní metody využívané pro stanovení celkového obsahu fenolických látek patří metoda FCM a PBM. Metoda FCM je založená na oxidaci fenolů v alkalickém prostředí a současné redukci fosfowolframovo-molybdenového komplexu prostřednictvím

Folin-Ciocalteuova činidla, kdy vznikne modrý roztok. Absorbance tohoto roztoku je měřena při 760 nm a je závislá na obsahu jednotlivých látek ve vzorku.

Při metodě PBM je anion fenolátu oxidován na radikál fenolátu a zároveň dochází k redukci hexakynoželezitanu na hexakynoželesnatan, to znamená, že se tvoří berlínská modř $K_x(Fe_n^{3+}[Fe^{2+}(CN)_6]_3)$ a zelená barva se změní na modrou. Absorbance se měří při vlnové délce 720 nm. Naměřené hodnoty jsou u obou metod vyjádřeny jako ekvivalentní množství kyseliny gallové, která se používá jako standard [22,23].

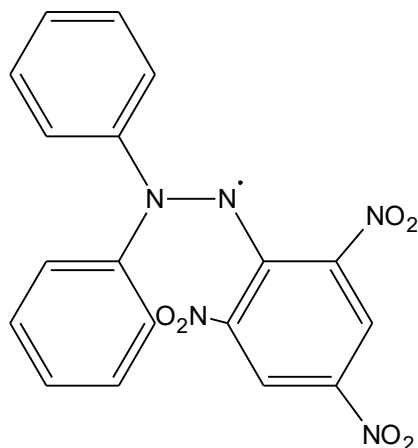
Stanovení antioxidační kapacity

Pro stanovení antioxidační kapacity existují dvě hlavní metody, metoda ABTS a DPPH. Při první zmíněné metodě se využívá ABTS radikálového kationtu, jehož strukturu lze vidět na obrázku 11. Modrozelený radikál kation ABTS^{•+} se připravuje oxidací $K_2S_2O_8$ nebo dalších iniciátorů jako je $K_4[Fe(CN)_6]$ nebo AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropan)dihydrochlorid). Po přidavku antioxidantu dochází k odbarvení tohoto roztoku. Jeho absorbance je měřitelná ve viditelné oblasti v rozshahu vlnových délek 600–750 nm a může se využít několika absorpčních maxim, z nichž nejčastější je 734 nm. Relativní antioxidační aktivita je vztažena ke koncentraci standardu Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina). ABTS metoda je vhodná pro měření hydrofilních i lipofilních antioxidantů. Nevýhoda této metody je malá selektivita při reakci s donory vodíkových atomů. Dříve byla metoda ABTS založena na principu aktivace metmyoglobinu s peroxidem vodíku v přítomnosti ABTS, kde došlo ke vzniku kation radikálu po přidavku antioxidantů. Dnes se již tohoto principu nevyužívá, jelikož bylo prokázáno, že některé antioxidanty reagují rychleji a přispívají k redukci ferryl myoglobin radikálu [24-29].



Obrázek 11: Struktura ABTS.

Princip metody DPPH je založen na vzniku stabilního volného radikálu DPPH[•], který může být na základě chemické struktury (obrázek 12) akceptorem atomu vodíku. DPPH metoda poskytuje s donory vodíku selektivnější reakci než u ABTS^{•+}. Vlivem přídavku antioxidantu k roztoku DPPH v methanolu dochází ke ztrátám radikálu a odbarvení původně modrofialového zbarvení měřeného při 515 nm. DPPH metoda je využívána především pro stanovení antiradikálové aktivity čistých syntetických antioxidantů nebo fenolických látek v potravinách [27,29-32].



Obrázek 12: Struktura radikálu DPPH.

Metoda založená na eliminaci kyslíkových radikálů

Principem této metody (známé též jako ORAC) je vznik peroxylového radikálu β -fykoeritrinu pomocí oxidace činidla ABAP (2,2'-azobis-2-methyl-propionamidin). Radikál se stanoví kvantitativně fluorimetricky a hodnotí se schopnost testované látky zpomalit nebo zastavit radikálovou reakci. Tato metoda je využívána především pro charakterizaci antioxidantů [33].

Metoda založená na redukci Fe³⁺ (FRAP)

Metoda FRAP je založena na redukci železitých komplexů s 2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazinem) (Fe³⁺ - TPTZ) v kyselém prostředí na železnaté komplexy (Fe²⁺ - TPTZ). FRAP vykazuje absorpci při 593 nm. Jako chromogenní ligand lze použít místo TPTZ i 1,10-fenantrolin nebo hexakynoželezitan [34].

1.1.4 Extrakce

Základem pro stanovení jednotlivých fenolických látek je jejich izolace z matrice vzorku, separace, identifikace a kvantifikace [35,36]. Pro izolaci fenolických látek s antioxidačními účinky z materiálů rostlinného původu, jako je ovoce, zelenina, obiloviny atd. se nejčastěji využívají různé extrakční metody [37-39]. Extrakční účinnost může ovlivnit mnoho faktorů jako je složení a množství rozpouštědla, doba extrakce nebo teplota [40,41].

Nejvíce využívanou je extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE), která slouží jako předseparační a koncentrační metoda. Podstatou této techniky jsou rozdílné fyzikálně-chemické vlastnosti extrahovaných látek, zejména velikost jejich rozdělovacího koeficientu. Výhoda této techniky je především jednoduchost z hlediska provedení a vybavení. Naopak mezi nevýhody patří tvorba emulzí, vysoká spotřeba organických rozpouštědel, nepoužitelnost pro polární látky, časová náročnost a nutnost odpaření rozpouštědla [40,42].

Rozpustnost fenolických látek závisí na polaritě použitého rozpouštědla a stupni polymerace fenolů. Proto neexistuje univerzální postup, který by byl vhodný pro extrakci všech fenolů nebo specifické třídy fenolických látek v rostlinných materiálech. Mezi nejčastěji využívané kombinace rozpouštědel pro extrakci fenolů se řadí methanol, ethanol, aceton, voda, ethylacetát a v menší míře propanol a dimethylformamid [40].

Mezi další techniky patří extrakce tuhou fází (SPE) [43-46], jejíž hlavní výhody jsou univerzálnost, rychlost separace, nízká spotřeba extrakčních činidel, nízká cena, vysoký obohacovací faktor, jednoduchost a vysoká účinnost. Další metody extrakce flavonoidů jsou extrakce v mikrovlnném poli (MAE) a extrakce podpořená ultrazvukem (UE). Výhody těchto technik jsou snížení doby extrakce a zvýšení výtěžků. Nevýhoda MAE je nízká selektivita a u UE pokles obsahu extrahovaných složek způsobený pravděpodobně v důsledku rozkladných procesů [35,47]. MAE se využívá především u produktů vyrobených z ovoce. Pro izolaci polyfenolických kyselin a flavonoidů je vhodná také extrakce nadkritickou tekutinou (SFE) [48], či zrychlená extrakce rozpouštědlem (PLE) [35]. SFE je technika, jejíž hlavní výhody jsou použití nízkých teplot, nižší spotřeba energie a vyšší kvalita produktu v důsledku absence rozpouštědel. SFE technika je ovšem omezena pro sloučeniny s nízkou nebo střední polaritou. PLE je novější moderní postup pro izolaci analytů z pevných vzorků, který používá vysoké tlaky a teploty nad jejich normální bod varu. Výhoda SFE, PLE a MAE je možnost extrakce v nepřítomnosti světla na které jsou fenolické látky citlivé [49,50].

1.1.5 Hydrolýza

Hydrolýza se využívá pro uvolnění vázaných fenolických látek ze vzorku pomocí vysoce koncentrovaných alkalických nebo kyselých činidel. Tato činidla způsobí hydrolytické rozložení esterové či etherové vazby, kterými jsou fenolické látky navázány na nerozpustné složky matrice. Fenolické látky se uvolní z nerozpustné frakce a zároveň i z glykosidické formy. Nevýhodou je především časová náročnost hydrolýzy [51]. Po alkalické hydrolýze následuje znovu okyselení roztoku a extrakce do organických rozpouštědel. Organická fáze je vysušena dusíkem nebo vakuem a odparek je rozpuštěn v methanolu nebo jeho vodném roztoku (v závislosti na počátečních podmínkách gradientu) [51-53].

Kyselá hydrolýza

Kyselá hydrolýza způsobuje štěpení glykosidických vazeb pomocí anorganické kyseliny (HCl, H₂SO₄). Probíhá při teplotě 90 °C a její časová náročnost se pohybuje od 45 minut [54] až po 4 hodiny [55]. Kyselá hydrolýza má širokou variabilitu podmínek, ale oproti alkalické je méně častá a má nižší účinnost. Důvodem je zahřívání látek v kyselém prostředí, které způsobuje vyšší ztráty a degradaci fenolických látek. Dále mohou být u kyselé hydrolýzy pozorovány nižší výtěžky oproti alkalické v důsledku rozložení esterové vazby. Během hydrolýzy je vhodné fenolické látky chránit proti rozkladu přidáním antioxidantu jako je kyselina askorbová nebo syntetický antioxidant terc-buthydrochinon (TBHQ) [51,53].

Alkalická hydrolýza

U alkalické hydrolýzy se esterově vázané fenolické látky uvolňují použitím hydroxidu sodného za laboratorní teploty po dobu 2-4 hodin [56,57]. Vzhledem k vysoké koncentraci NaOH dochází k degradaci některých fenolických kyselin, především kyseliny gallové a kávové, a proto se do reakční směsi přidává kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) a kyselina askorbová, které tuto degradaci potlačí [58]. Nejčastěji se využívá laboratorní teploty, proto u tepelně nestabilních látek nedochází k degradaci. Alkalická hydrolýza se nejvíce využívá právě v případě analýzy obilovin a pseudoobilovin, kde jsou fenolické látky vázány na buněčné stěny zrna [51,52,59].

Enzymatická

Další alternativou je využití enzymatické hydrolýzy, která je založená na enzymatickém štěpení stavebních složek buněčných orgánů, čímž dochází k lepšímu pronikání rozpouštědla

do buněk. Probíhá za mírných podmínek, a tak během celého procesu nedochází k úbytku fenolických kyselin vlivem teploty či extrémního pH. Nejčastěji se používají enzymy amylázy a celulózy, které štěpí vazby mezi fenolickými látkami a glykosidy, ale je možnost použít i jiné alternativy jako jsou hemicelulózy či pektinázy [60]. Za určitých podmínek lze kombinovat enzymatickou hydrolýzu s kyselou či zásaditou hydrolýzou, ale je nutná úprava pH vzorku [61]. Důvodem je, že enzymy fungují pouze v mírně kyselém prostředí, zatímco u kyselé či alkalické hydrolýzy probíhá reakce v koncentrovaných kyselinách nebo zásadách. U obilovin je vhodné použít především α -amylázu a celulózu, protože jejich buňky jsou tvořeny převážně škrobem a celulózou. Enzymatická hydrolýza bývá využívána především při stanovení fenolických látek v ječmeni nebo rýži [62,63].

1.1.6 Kapalinová chromatografie

Jednou z nejrozšířenějších metod pro stanovení fenolických látek v potravinách je kapalinová chromatografie. Nejběžnější variantou je HPLC v systémech s obrácenými fázemi, kde se jako mobilní fáze využívá vodná složka a méně polární organické rozpouštědlo (například acetonitril nebo methanol). Do vodné fáze se obvykle přidávají kyseliny nebo pufrы (například kyselina mravenčí, octová nebo fosforečná), a to z důvodu snížení hodnoty pH mobilní fáze, což je nezbytné k separaci fenolických kyselin [35,36]. Jako stacionární fáze se používá nepolární oktadecylsilikagelová (C18) a oktylová (C8) kolona nebo další nepolární stacionární fáze [35,36,64,65]. Výhodou u RP-HPLC je možnost použití monolitických kolon, jejichž hlavními přednostmi jsou vynikající hydrodynamické vlastnosti umožňující zvýšení průtoku mobilní fáze [35]. Zpravidla se využívá gradientové eluce [35,36,65-69] s různými druhy mobilních fází, ovšem vždy se jedná o binární systémy [35,65,67]

K detekci se využívá především spektrofotometrický detektor [36,64,66,68,70-72], a/nebo hmotnostní spektrometr (MS). Spojení kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS/MS) je díky vysoké citlivosti, selektivitě a specifičnosti jedna z nejslibnějších metod pro analýzu fenolických látek v různých biologických matricích [73,74]. Využívá se hlavně pro analýzu komplexních flavonoidů a jejich glykosilovaných derivátů a acylovaných konjugátů. Největší rozvoj zaznamenala HPLC-MS po zavedení ionizačních technik pracujících za atmosférického tlaku, jako je například ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI). Z hlediska analýzy fenolických látek jsou nejvýznamnější ESI a APCI [75-77].

Jako analyzátor se ke stanovení fenolických látek pomocí HPLC-MS nejčastěji využívá trojitý kvadrupól (QqQ) v MRM (multiple reaction monitoring) skenovacím módu. Tato kombinace poskytuje vysokou selektivitu a citlivost a lze s její pomocí kvantifikovat více než sto analytů během jedné analýzy. Nevýhoda je velká časová náročnost z důvodu optimalizace parametrů vybraných látek a nelze ji použít pro screening necílených sloučenin [78-80]. Pro necílenou analýzu neznámých látek se využívá analyzátorů s vysokým rozlišením jako je analyzátor doby letu (TOF) [81,82]. Protože všechny analyzátoři neumožňují MS/MS experimenty jsou často kombinovány [83]. Pro necílenou analýzu je častá kombinace kvadrupólu s TOF analyzátořem (QqTOF) nebo Orbitrapu s lineární iontovou pastí (LTQ-orbitrap) či kvadrupólem. Výhoda těchto hybridních analyzátořů je vysoká citlivost, rozlišení a přesnost určení hmoty [81].

Z hlediska ochrany životního prostředí je dnes hlavním cílem rozvoj tzv. „zelené“ chemie, jejíž princip je založen na snižování spotřeby rozpouštědel, zmenšení vnitřních průměrů kolon, velikosti částic a celková miniaturizace. Acetonitril a methanol jsou nahrazovány méně škodlivými alternativami. Dalším cílem je urychlení separace, čehož může být dosaženo zvýšením teploty nebo použitím kolon plněných stacionární fází o velikosti částic menších než 2 μ m (UHPLC) [75,76].

1.2 MED

1.2.1 Základní charakteristika a složení medu

Med je sladká, viskózní kapalina, která je tvořena včelami medonosnými (*Apis mellifera*). Skládá se z přibližně 180 druhů různých sloučenin [84]. Přesné složení medu je variabilní v závislosti na botanickém a geografickém původu rostlin, které včely opylují. Dále složení medu ovlivňuje i jeho zpracování [85]. Botanické faktory zahrnují především vliv chemického ošetření a typ rostlin. Geografické faktory klima, místo a období sběru a okolní podmínky [86].

Majoritními složkami medu jsou fruktóza a glukóza, jež dohromady tvoří 65-80 % celkových cukrů. Kromě těchto dvou monosacharidů obsahuje kolem 25 oligosacharidů. Mezi nutričně relevantní patří panóza, 1-kestóza, 6-kestóza a palatinóza [87,88]. Cukry v medu slouží jako zdroj energie a přispívají k některým fyzikálním vlastnostem, jako je viskozita, hygroskopičnost a granulace [89,90]. Mezi jedny z nejvýznamnějších minoritních složek medu patří enzymy. Konkrétně se jedná o tři hlavní enzymy, do nichž patří diastáza (amyláza), která rozkládá škrob nebo glykogen na menší cukerné jednotky. Dále invertáza (sacharáza, glukosidáza), rozkládající sacharózu na fruktózu a glukózu a glukózooxidáza, která z glukózy produkuje peroxid vodíku a kyselinu glukonovou. Vzhledem k tomu, že sliny poskytují dostatečně vysokou aktivitu amylázy a glukózooxidázy, má med minimální vliv na trávení cukru. Mezi další komponenty medu patří aminokyseliny (prolin), organické kyseliny (kyselina glukonová, kyselina octová atd.), bílkoviny, vitamíny (B₁-B₆, C), těkavé sloučeniny, pigmenty, fenolické látky a minerální látky (Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Na, Zn) [89].

1.2.2 Vlastnosti a využití medu

Med zabraňuje oxidačním reakcím v potravinách, a proto působí jako přírodní antioxidant. Antioxidační aktivitu medu způsobuje obsah polyfenolů, které mají i zdraví prospěšné vlastnosti. Mezi nejvýznamnější patří fenolické kyseliny (např. kyselina ferulová, kávová, chlorogenová, vanilová, kumarová, benzoová a skořicová) a flavonoidy (např. kvercetin, apigenin, luteolin, pinocembrin, hesperetin, chrysin, myricetin, kaempferol, pinobanksin a galangin) [70]. Zastoupení jednotlivých polyfenolů ovlivňuje antioxidační vlastnosti medů. Barva medu závisí na původu (zdroji rostlin či stromů, ze kterých med pochází), teplotě a době skladování. Tmavší medy mají v porovnání se světlejšími často vyšší

obsah fenolických látek, a tedy i antioxidační aktivitu [91-95]. Med ovlivňuje i oxidační reakce v potravinách (oxidace lipidů v mase nebo enzymatické hnědnutí ovoce a zeleniny) [96,97].

1.2.3 Klasifikace medu

Medy lze klasifikovat podle původu, způsobu zisku nebo například obchodní úpravy. Původem jsou myšleny typy květin, ze kterých včely sbírají nektar a pyl pro výrobu medu. Jedná se například o med květový, lesní, horský, akátový, citrusový, manukový, tupelový kapradinový či smetanový. Z tohoto důvodu mají medy rozdílné složení a fyzikální a organoleptické vlastnosti. Klasifikace podle původu poskytuje spotřebitelům informace o regionu a rostlinách, které ovlivňují vlastnosti medu. Klasifikace dle způsobu jakým je med získán rozděluje medy na květový, lesní, horský, léčivý, propolisový med a včelí pyl. Všeobecně se ovšem používají dva základní typy medu, a to med květový (nektarový) a medovicový (lesní). Medovicový med je získán ze sekretů hmyzu sajících nektar z rostlin a jeho tmavší barva je způsobena rostlinnými barvivy, která se nachází v míze dřevin [98-101]. Květový med je tvořen z nektaru rostlin a v porovnání s medovicovým medem je charakterizován světlejší barvou, méně výraznější chutí, vyšší antioxidační aktivitou a vyšším obsahem monosacharidů a jednoduchých cukrů, které způsobují jeho snazší krystalizaci a stravitelnost [98,99].

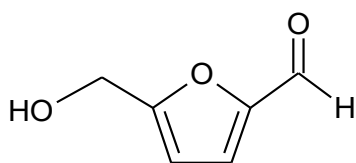
1.2.4 Výroba medu

V některých případech je před dodáním na trh surový med podroben procesu industrializace z důvodu požadavků spotřebitelů na tekutý, nekystalický produkt. Mezi významné faktory, které krystalizaci ovlivňují, patří teplota, geografický a botanický původ a obsah vody a cukrů. Průmyslová výroba medu se skládá ze dvou fází tepelné úpravy. První fáze zkapalnění poskytuje lepší manipulaci s produktem (cca 55 °C). Druhou fází je pasterizace (cca 80 °C), která je významná z hlediska eliminace kvasinek ovlivňující nežádoucí fermentaci během skladování produktu. Důvodem je rozpuštění krystalizačních jader, které ovlivňují tuhnutí medu (med zůstane v kapalné formě delší čas) [68,102-107]. Tepelné zpracování medu však není doporučováno z důvodu ovlivnění obsahu biologicky aktivních látek, zejména enzymů, těkavých sloučenin a cukrů. Proto ve většině případů včelaři med tepelně neupravují [108-110].

1.2.5 Kvalita a autenticita medu

Mezi hlavní parametry kvality a ceny medu patří zejména organoleptické vlastnosti. Časově náročná a komplikovaná výroba však zvyšují jeho cenu, a proto bývá často falšován [68,111]. V případě medu se nejčastěji jedná o přímé nebo sekundární přídavky levnějších sladidel. Falšování medů se ovšem neomezuje jen na přímé přidávání cukrů do přírodního medu, ale dochází i k nepřímému krmení včelstev koncentrovanými roztoky cukrů a poslední variantou je míchání dražšího medu s levnějším. Jako náhražky se u přímého falšování používají škrobové sirupy a invertní sirupy. V případě nepřímého falšování se včelstva přikrmují kukuřičným sirupem s vysokým obsahem fruktózy a sacharózovým sirupem [64,69,89]. Official Journal of the European Communities (2001) používá ke sledování falšování medu řadu parametrů jako je například koncentrace fruktózy a glukózy (květový med ≥ 60 % (w/w), medovicový ≥ 45 % (w/w)), koncentrace sacharózy (≤ 5 % (w/w)), vlhkost (≤ 20 % (w/w)) a elektrická vodivost (květový med $\leq 0,8$ mS/cm, medovicový a kaštanový med $\geq 0,8$ mS/cm). [89]

Mezi důležité parametry kvality medu se rovněž řadí obsah 5-hydroxymethylfurfuralu (HMF) a fenolických látek v medovině. HMF (obrázek 13) je cyklický aldehyd, který vzniká degradací cukrů, což způsobuje snížení nutriční hodnoty výrobku. Tato sloučenina je tvořena dehydratací hexos v kyselém prostředí a její vznik zároveň souvisí s tepelnou úpravou medu nebo medového zákvasu. Slouží jako indikátor přehřátí medu či skladování ve špatných podmínkách a jeho výskyt v medu má výrazný vliv na jeho barvu, chuť a vůni. [68,102,103].



Obrázek 13: Základní struktura HMF.

Aplikace HMF ve formě indexu kvality je založena na faktu, že není přítomen v čerstvém medu a jeho finální koncentrace v medu je pouze důsledek skladování nebo zahřívání. To je významné zejména pro polyflorální medy, jelikož mají v porovnání s těmi monoflorálními velmi odlišné chemické složení. Koncentrace HMF v medu by neměla být vyšší než 40 mg/kg a u tropického medu 80 mg/kg. Vyšší koncentrace HMF v medu indikuje jeho přehřátí, nevhodné skladovací podmínky, dlouhodobé skladování, nebo že je med staršího původu [68,102,103,112].

1.3 MEDOVINA

1.3.1 Základní charakteristika a klasifikace medovin

Medovina je tradiční alkoholický nápoj, jehož původ je znám již od starověku. Obsahuje od 8-18 % ethanolu (v/v). Základní složení je fermentovaná směs medu a vody, ale lze najít mnoho variant s příměsí ovocných šťáv a koření. Vzhledem ke skutečnosti, že její základ tvoří med, má velmi podobné chemické složení a vlastnosti [113-117].

Zahraniční literatura [118] klasifikuje medoviny na více druhů. Mezi nejvýznamnější patří „metheglin“, který je charakterizován sladkou chutí a příměsí koření (muškátový oříšek, zázvor, vanilka a skořice) nebo bylinek. Příměsí koření výrazně ovlivňují chuť medoviny a upozadí samotný med, přesto v České republice převažuje výroba právě tohoto druhu medovin. Dalším druhem medoviny je „melomela“, kde je voda nahrazena ovocnou šťávou. Výhoda této varianty je především v nižší výrobní ceně, protože ovocná šťáva je cenově dostupnější v porovnání s medem. Existují i speciální druhy melomely, například „Pyment“, kde je voda nahrazena hroznovým moštem. Kromě ovocných šťáv jsou využívány i ovocné džusy. Nejznámější variantou je „Cyser“, což je fermentovaná směs medového roztoku a jablečného džusu [113-117]. Mezi speciální druhy lze zařadit „bochet“, který je připravován ze zkaramelizovaného medu a „sack mead“, kde se využívá vyššího obsahu medu a nefermentovaných cukrů a medovina je charakterizována výraznou sladkou chutí. Obdobně jako další nápoje lze medoviny dělit také na perlivé, neperlivé a šumivé [118,119].

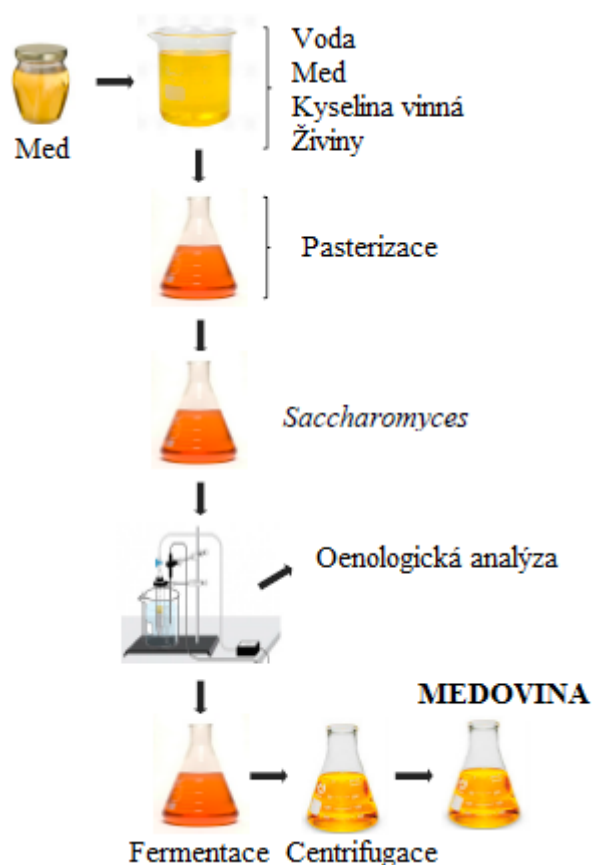
1.3.2 Výroba medovin

Tradiční způsob produkce medovin je složen z několika základních kroků (viz obrázek 14). Nejprve je smícháním vody (případně ovocné šťávy) a medu připraven medový zákvas s následnou úpravou pH. Kvalita a vlastnosti finálního závasku závisí na množství mikroorganismů [120], což je ovlivněno nejen typem medu, ale i podílem vody [67,113,121,122]. Zředovací faktor medu závisí na tom, jakého finálního produktu (druhu medoviny) je potřeba docílit [123]. Kromě medu a vody lze přidat před nebo po fermentaci i další aditiva (ovocné šťávy, pyl, kyselinu citrónovou atd.) Tyto přísady ovlivňují zejména rychlost a cenu fermentace, množství alkoholu a finální vlastnosti medoviny [113,124].

Při kvašení dochází k přeměně glukózy a fruktózy na ethanol a oxid uhličitý. Po přípravě závasku dojde ve většině případů k pasterizaci a naočkování pomocí kvasinek. Výběr kvasinek

ovlivňuje množství alkoholu a celkovou kvalitu (chuť a aroma) medoviny. Nejběžnější je kmen *Saccharomyces cerevisiae* [125] a D47 ICV [115,126].

Dalším krokem je postupná fermentace a dokvašování. Fermentace je stabilnější při nižších hodnotách teploty (15 °C), kdy dochází k lepšímu přechodu aromatických a vonných látek do finální medoviny. Zatímco vyšší teplota (nad 25 °C) způsobuje i vyšší rychlost kvasného procesu [113,114,127,128]. Celý proces fermentace a maturace medoviny (poslední krok ve fermentačním procesu) může trvat od několika týdnů až po několik měsíců případně let. Významnými faktory ovlivňujícími fermentaci medovin jsou dostatek základních živin, hodnota pH a míchání během kvašení. Často dochází i ke vzniku bakteriální sekundární fermentace nebo refermentace, které jsou důvodem nežádoucího aroma (ethylacetát, oktanová a hexanová kyselina). Nežádoucí aroma mohou způsobit i kvasinky, které zůstávají v medovině v důsledku nesprávné filtrace [116,120,129]. Výsledný produkt se následně odstředí za účelem eliminace nežádoucího materiálu [113,115].



Obrázek 14: Základní schéma moderní výroby medoviny [113].

Celkovou kvalitu medovin ovlivňuje typ medu, přidané látky, kvasinková mikroflóra, zahřívání a ředění medu a fermentační a maturační proces [130-132]. Pro výrobu medovin je nejvhodnější medovicový (tmavý) med, který má vyšší hodnotu pH a obsahuje vyšší koncentraci minerálních

látek, z čehož vyplývá i menší riziko interferencí při fermentaci [113,114,127,128]. Z hlediska kvality je pro spotřebitele medovin důležité zajištění rovnocenných podmínek na hospodářském trhu [132]. Nedostatečné legislativní ošetření výroby medovin zvyšuje možnost pro falšování tohoto produktu, proto je velmi důležitá optimalizace parametrů pro stanovení kvality medovin. Vyhláškou č. 335/1997 Sb ministerstva zemědělství bylo stanoveno pouze použití nejméně 280 g medu na 1 litr medoviny [132-134]. Jako indikátor kvality medoviny by mohl sloužit již zmiňovaný HMF, který vzniká tepelným zahříváním medu či obsah fenolických látek, které se v medovině nachází, pokud byl k její výrobě použit kvalitní med. Kromě celkového fenolického profilu je pro klasifikaci medovin důležitý i obsah jednotlivých fenolických látek. Například vysoká koncentrace vanilinu současně s nízkou koncentrací ostatních fenolických látek, může indikovat falsifikaci produktu. V případě dostatečného množství dalších fenolických látek se může jednat pouze o přídatnou látku sloužící k dochucení medoviny [120]. Medoviny lze tedy klasifikovat dle způsobu přípravy na vařené a nevařené. U vařených medovin se medový roztok přenese do dvou třetin výšky nádoby a mírně se vaří. Během varu je sbírána pěna, která obsahuje vyplavené nečistoty. Pomocí tohoto procesu dojde k eliminaci bílkovin a nežádoucího zakalení. Celková délka procesu je individuální v závislosti na tom, kdy přestane vznikat pěna. Produkce nevařených medovin probíhá smísením panenského medu, vody a kvasinek. Aby nedošlo k tepelné degradaci významných látek v medu, probíhá toto smísení za chladu nebo mírně zvýšené teploty. Během výroby jsou využívány medy vyšších organoleptických kvalit, kde nedochází ke změně žádných jakostních parametrů medu, které by byly za zvýšené teploty znehodnoceny [119].

1.4 PSEUDOObILOVINY

Pseudoobiloviny jsou řazeny mezi dvouděložné rostliny. Název pseudoobiloviny se používá díky podobným rysům se semeny pseudoobilovin a zrny obilovin. Mají obdobné vlastnosti, způsob pěstování, zpracování, vzhled i využití jako klasické obiloviny. Mezi nejvýznamnější zástupce pseudoobilovin patří pohanka (*Fagopyrum spp.*), amarant (*Amaranthus spp.*), quinoa (*Chenopodium quinoa*) a chia (*Salvia hispanica*) [135-137]. Z hlediska nutričního porovnání s klasickými obilovinami obsahují více bílkovin, minerálních látek (fosfor, hořčík, draslík) a vlákniny, proto jsou významné i z hlediska prevence kardiovaskulárních onemocnění, rakoviny, obezity, cukrovky, arterosklérózy nebo vysokého krevního tlaku [137-140]. Mezi jejich hlavní výhody se řadí absence lepku, což je směs bílkovin obsažená v zrnech, a proto jsou vhodné především pro celiaky a stávají se moderním trendem v oblasti zdravé výživy [137-143]. Tento nedostatek lepku v pseudoobilovinách ovšem znesnadňuje jejich zpracování nebo vyžaduje alespoň některé specifické úpravy [144].

V budoucnu by z nutričního hlediska mohly být pseudoobiloviny významnou alternativou a potenciálním přínosem především v zemích, kde chybí dostatek zdrojů bílkovin. Ze sociálně-ekonomického hlediska mají význam i pro země, kde je produkce potravin omezená. S ohledem na životní prostředí mohou pseudoobiloviny také zlepšit a zvýšit rozmanitost přírodních zdrojů [137-144].

1.4.1 Pohanka

Pohanka (*Fagopyrum esculentum*) patří mezi jednoleté rostliny a je řazena do čeledi rdesnovitých (*Polygonaceae*) [145]. Čeleď rdesnovité obsahuje 50 rodů a 1 120 druhů, velká část z nich jsou ovšem plané formy. V potravinářském průmyslu je významný rod *Rheum* a *Fagopyrum*. Rod *Fagopyrum* zahrnuje přibližně 15 druhů, z nichž jsou nejznámější dva, mezi které patří pohanka obecná (*Fagopyrum esculentum Moench*) a pohanka tatarská (*Fagopyrum tataricum*). Rozdíl mezi nimi je především v chuti. Pohanka obecná je označována za sladkou a pohanka tatarská je pro svoji vysokou koncentraci flavonoidů označována za pohanku hořkou. Pohanka tatarská obsahuje vyšší koncentraci rutinu a vitamínu B, dále obsahuje kvercetin a kvercitrin. Její hořkost způsobuje tanin, který se v klasické pohance nevyskytuje. Mezi další typy určené ke konzumaci řadíme pohanku setou (*Fagopyrum esculentum*) a pohanku vytrvalou (*Fagopyrum cymosum Meissn*) [146,147].

Pohanka je cizosprašná a hmyzosubná rostlina, jejíž výška se pohybuje v rozmezí 0,7-1,5 m [148]. Má slabý kulový a minimálně větvený kořen a přímou, rýhovanou a dutou

lodyhu. Vyznačuje se červenou barvou v závislosti na koncentraci antokyanů. Listy pohanky jsou na stonku rozloženy střídavě. Tvar horních listů je šípovitý, kdežto tvar spodních je řapíkatý. Květenství je tvořeno 7-9 listy a jejich počet je různý v závislosti na odrůdě. Květy jsou malé a oboupohlavné s růžovým, bílým nebo červeným odstínem barvy. Velikost zrn pohanky se pohybuje v rozmezí 4-9 mm. Zrna mají tvar trojúhelníku a jejich povrch tvoří tmavá, suchá a tvrdá nažka [138,148-151]. Pohanka se využívá především v podobě potravin (mouka, pohankový med), léčivých přísad ve farmacii, hnojiva, krmiva nebo plnidla do polštářů (slupky) [135,148,149].

Chemické složení pohanky je ovlivněno druhem, způsobem zpracování a okolními podmínkami. Trojbokou nažku tvoří sacharidy, bílkoviny, aminokyseliny, tuk, vláknina, a další. Nejvýznamnějším sacharidem je škrob, jehož obsah je 55-70 % v závislosti na jednotlivých odrůdách. Je zodpovědný za konzistenci a chuť finálních pohankových potravin [152,153]. Obsah bílkovin v pohance se pohybuje kolem 12 % a tvoří jej albuminy, globuliny a gluteliny. Vzhledem k tomu že neobsahuje prolaminy, je pohanka řazena mezi bezlepkovou stravu [154,155]. Dále je pohanka tvořena celkem 18 různými aminokyselinami, z nichž je nejvýznamnější lysin, jehož obsah je mnohem vyšší v porovnání s ostatními obilovinami [148,156,157]. Samotná pohanka je také významným zdrojem vitaminů (B, C, E a cholin) [153,158] a minerálů (K, Mg, P, Fe, Ca, Cu, Zn, Se, Ba, B, I a Co). Dále pohanka obsahuje i významné množství fenolických látek, které jsou u konvenčních obilovin vázány na buněčnou stěnu, zatímco v pohance se vyskytují v celém zrnu. Mezi nejvýznamnější flavonoidy patří: rutin, kvercetin, orientin, vitexin a isoorientin, z fenolických kyselin je nejvýznamnější kyselina *p*-hydroxybenzoová, kávová a ferulová [137,153]. Nejvíce zastoupenou fenolickou látkou v pohance je rutin, jehož obsah je v porovnání s ostatními obilovinami mnohonásobně vyšší. Obsah rutinu je ovlivněn okolními podmínkami a odrůdou (pohanka tatarská má prokazatelně vyšší obsah než pohanka obecná, a proto má hořkou chuť). Z toho vyplývá, že růstové faktory a konkrétní druh obiloviny významně přispívá k obsahu fenolických látek a z toho vyplývající antioxidační aktivitě [148,152,156].

1.4.2 Amarant

Základní charakteristika a klasifikace

Amarant (laskavec) je řazen do rodu *Amaranthus*, čeleď *Amaranthaceae* (laskavcovité). Z hlediska taxonomie je tento rod rozdělen do dvou sekcí *Blitopsis* (trojčlenné květy) a *Amaranthus* (pětičlenné květy). Je známo okolo 75 druhů, ale pro potravinářský průmysl jsou nejvýznamnější tři: *Amaranthus cruentus*, *Amaranthus caudatus* a *Amaranthus*

hypochondriacus. Ostatní druhy se využívají jako okrasné. Nejvýznamnější rozpoznávací faktory jsou hustota květenství a tvar okvětních lístků [137,148]. Květy amarantu jsou jednopohlavní a listy jsou zelené a řapíkaté. Plodem je tobolka, která je tvořena bíložlutými semeny ve tvaru čočky o velikosti 0,8-1,5 mm. V porovnání s klasickými obilovinami je amarantové zrno menší (0,9 - 1,7 mm). Hmotnost je kolem 0,6-1,0 g na 1000 semen. Semeno je obdobně jako u pohanky složeno z embrya, endospermu a perispermu [148,158].

Chemické složení amarantu závisí na několika faktorech (druh, okolní podmínky, technologické zpracování). Amarant je významný zejména pro své nutriční hodnoty, obsahuje bílkoviny, aminokyseliny, fenolické látky, vlákninu, lipidy, vitamíny, prekurzory vitamínů a minerální látky. Obsah bílkovin v amarantu se pohybuje kolem 14 % v závislosti na druhu rostliny, klimatických a půdních podmínkách a způsobu hnojení [159-161]. Bílkovinný komplex se skládá z albuminů, globulinů, prolaminů a glutelinů [159,162]. Z důvodu nízkého obsahu prolaminů je stejně jako pohanka vhodný i pro celiaky [152,163,164]. Nejvýznamnější aminokyselinou obsaženou v amarantu je lysin, jehož obsah se pohybuje okolo 61-80 % [149,165]. Hlavním sacharidem obsaženým v amarantovém zrnu je sacharóza (dvojnásobný obsah, než u konvenčních obilovin jako je pšenice) [166-168]. Mezi další sacharidy patří inositol, maltóza, rafinóza a stachyóza [159,161]. Významný je i obsah škrobu (65-75 %). Zrna amarantu jsou dále důležitým zdrojem minerálních látek, jako jsou mangan, nikl, chrom, zinek, měď a selen. Především obsah železa v amarantu je několikrát vyšší než v tradičních obilovinách [169,170]. Amarant je i významným zdrojem lipidů, které jsou obsažené především v klíčcích amarantového zrna, z nich většinu tvoří nenasycené mastné kyseliny (kyselina linolová) a menší část nasycené mastné kyseliny (kyselina olejová a palmitová) [135,165,171-173]. V amarantovém zrnu jsou dále i flavonoidy a fenolické kyseliny, jejichž nejvyšší koncentraci nalezneme ve vnějších vrstvách zrna. Dále obsahuje především volné fenolické kyseliny, ale v celé rostlině je vyšší obsah vázaných kyselin například 4-O-glykosid kyseliny ferulové. Mezi zástupce volných kyselin se řadí kyselina gallová, vanilová, 4-hydroxybenzoová, *p*-kumarová, kávová a ferulová, které slouží jako prevence proti škůdcům (hmyz a mikroorganismy). Naopak v listech a stoncích amarantu je nejvyšší obsah flavonoidů a jejich derivátů (rutin, vitexin, isovitexin, kvercetin, isokvercitrin nebo nikotiflorin) [139,142,167,171]. Ve srovnání s konvenčními obilovinami je obsah flavonoidů v amarantu vyšší [143,153,174,175].

1.5 STANOVENÍ FENOLICKÝCH LÁTEK V PŘÍRODNÍCH MATRICÍCH

1.5.1 Úprava a extrakce vzorku

Z důvodu degradace analyzovaných fenolických látek je úprava vzorku před vlastní analýzou velice důležitá. V případě pseudoobilovin se využívají již připravená mechanicky loupaná zrna [139,141,176-180], listy [178,181-185] nebo klíčky [139,141,176,186]. Zrna jsou upravena technologickým procesem (sušení, lyofilizace nebo zmrazení) [187]. Z hlediska zachování všech nutričních vlastností a vzhledu zrna je nejvýznamnější lyofilizace. Po rozemletí zrn na mouku [188] následuje homogenizace pomocí síta o průměru částic 0,3-0,85 mm [181,189]. V případě nutnosti eliminace lipofilních sloučenin je nezbytná extrakce *n*-hexanem [177,178,180,183].

Pro vzorky medu a medovin je před vlastní analýzou nutné odstranit ze vzorku cukry a případně zakoncentrovat fenolické látky [35,190]. Zakoncentrování je provedeno nejčastěji pomocí LLE extrakce (systém kapalina-kapalina), kde se využívají vodné roztoky rozpouštědel ethanolu [35,176-178,180], MeOH (methanolu) [141,176-179,181-184,191], acetonu [176,183], diethyletheru [185] nebo ethylacetátu [182]. Zvýšení extrakční účinnosti lze dosáhnout pomocí slabé organické kyseliny [176,184] nebo silné zředěné kyseliny [176,183]. Pevná a kapalná část vzorku pseudoobilovin je rozdělena pomocí centrifugy [176, 179,180]. Mezi další obohacovací metody patří SPE extrakce (systém kapalina-pevná látka), kde se využívá extrakčních patronek s variabilními sorbenty. Mezi nejznámější sorbenty patří Amberlite XAD [36], Bond Elut C18 nebo Dowex 50WX8 [46]. Směs vzorku s vodou (cca 1:5) je po okyselení zfiltrována a aplikována do patronky, která zachytí přibližně 95 % fenolických látek a ostatní sloučeniny z matrice (cukry, jiné polární látky) pouze projdou patronkou bez významných interakcí. Následným promývacím krokem (voda s přísadkou HCl) se odstraní stopy matrice a cílové fenolické látky jsou eluovány organickým rozpouštědlem. Následuje sušení dusíkem [180] nebo sušení za sníženého tlaku a teploty 40 °C [33] až 45 °C [153,181]. Extrakty jsou zpravidla uskladněny bez přístupu světla při teplotě 4-5 °C [191]. Mezi další obohacovací metody patří mikrovlnná extrakce (MAE), extrakce ultrazvukem (UE) a extrakce nadkritickou tekutinou (SFE) [35,47].

V případě analýzy vázaných fenolických látek je nezbytná alkalická [180,191,192] nebo kyselá hydrolyza [193] z důvodu přerušování vazeb fenolických látek na buněčnou stěnu obiloviny nebo pseudoobiloviny. Lze využít jedné hydrolyzy nebo i jejich kombinace.

Alkalická hydrolýza probíhá při laboratorní teplotě v přítomnosti různě koncentrovaného NaOH. Z důvodu vysoce alkalického prostředí, které by zapříčinilo degradaci fenolických látek, se přidává kyselina askorbová a EDTA [191]. Dokonalého promísení jednotlivých komponent se dosahuje laboratorní třepačkou nebo magnetickým míchadlem [180,181,191,193]. Kyselá hydrolýza probíhá na rozdíl od alkalické za vysoké teploty (např. 85 °C). Vázané fenolické látky jsou zde uvolněny pomocí kyseliny chlorovodíkové [191,194]. Oproti alkalické je kyselá hydrolýza časově méně náročná. Čas reakce je od 30 minut [191,194] do 1 hodiny [191]. Po alkalické i kyselé hydrolýze je nezbytná extrakce pomocí ethylacetátu [180] nebo diethyletheru [191]. Finální produkt je z důvodu eliminace rozpouštědla nakonec sušen pod tekutým dusíkem [180] nebo argonem [193]. Odparky se až do doby finální analýzy uchovávají při teplotě -20 °C [141,176,180,182].

1.5.2 Kvalitativní a kvantitativní analýza fenolických látek

Pro analýzu fenolických látek se obvykle používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie v systémech s obrácenými fázemi [35,46,64,194-199] a silikagelovými kolonami s chemicky vázanými C18 [194-199] nebo C8 [65] fázemi. Analýza fenolických látek v přírodních matricích probíhá zpravidla pomocí gradientové eluce [35,36,46,65,67] s mobilní fází, která se skládá z vody a organického rozpouštědla [35,46,65] nejčastěji acetonitrilu [141,171,175,178,179,183,184,194,196,199-201] nebo methanolu [64,68,69,133,200,202]. Pro potlačení ionizace analytů [203] je vodná část mobilní fáze okyselená prostřednictvím kyseliny mravenčí [46,194,196,204], octové [141,183,184,196,202,204], fosforečné [179,199], trifluoroctové [175,178,200] nebo octanu amonného [67]. Detekčním systémem pro stanovení fenolických látek v přírodních matricích je zpravidla hmotnostní spektrometr (MS) [197,205] nebo spektrofotometrický detektor, dále lze využít nukleární magnetické rezonance (NMR) [195,197,202,205,206]. Kromě jednotlivých detektorů se často využívá jejich kombinace například spektrofotometrický detektor s hmotnostním spektrometrem [196,197]. Pro kvantifikaci fenolických látek se v posledních letech stále více využívá spojení HPLC-MS [183,184], nejčastěji s ionizační technikou ESI [35,65,183,184,196,201,207] a QqQ jako analyzátozem [194,201] nebo lze využít analyzátozem doby letu (TOF) [208]. Rychlejší separace lze dosáhnout použitím kolon s velikostí částic menší než 2 μm (UHPLC), kdy s klesající velikostí částic, vzrůstá i účinnost separace a tlak. Mezi hlavní výhody UHPLC patří kromě rychlosti separace i snížení nákladů, zvýšení separační účinnosti a citlivosti a více kvalitativních informací [209]. Další komplementární technikou k HPLC-MS je CE-MS, kde největší výhodou je velmi nízká spotřeba vzorků, chemikálií a rozpouštědel. Tato kombinace

dále poskytuje vysokou rychlost, efektivitu prostřednictvím CE a selektivitu a citlivost pomocí MS. Využívá se především kapilární zónové elektroforézy (CZE), která umožňuje separaci směsi neutrálních a nabitých látek. Hlavní výhody kombinace CZE a MS je vysoké rozlišení a rychlost analýzy. Další spojení, které se využívá především kvůli identifikaci látek je kombinace micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC) s MS [36].

1.6 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

1.6.1 Medoviny

Přístroje a zařízení

Fenolické látky byly analyzovány s využitím kapalinového chromatografu ve spojení s hmotnostním spektrometrem QTRAP 4500 (AB SCIEX, Framingham USA). Kapalinový chromatograf obsahoval 2 čerpadla mobilní fáze LC-20AD, směšovač mobilní fáze, autosampler SIL-20A (vše Shimadzu, Kyoto, Japonsko) a termostat kolon LCO 102 single (Ecom, Praha).

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). K extrakci vzorků byla využita třepačka REAX 2 (Heidolph, Německo) a ultrazvuková vana K-12LE (Kraintek, Česká republika). K urychlení sedimentace byla použita centrifuga Universal 320 (Hettich, Německo). Vzorky byly odpařovány s využitím sušicí vany (Miulab, Čína) s přívodem dusíku. Dále byl použit pH-metr (Methrom 827, Švýcarsko), magnetické míchadlo s ohřevem MR 2002 (Heidolph, Německo) a sušárna (Carbolite Apex AX 120). Přechištění bylo provedeno pomocí stříkačkových polytetrafluorethylenových (PTFE) filtrů o velikosti pórů 0,45 μm (Labicom, Česká republika).

Použité chemikálie

Standardy

- kyselina salicylová, chlorogenová, gallová, ferulová (vše $\geq 99\%$), *p*-kumarová, *m*-kumarová, gentisová, isoferulová, vanilin, epikatechin (vše $\geq 98\%$), 3,4-dihydroxybenzoová, 4-hydroxybenzoová, vanilová, katechin, luteolin, 3,4-dihydroxybenzaldehyd (vše $\geq 97\%$), myricetin ($\geq 96\%$), kvercetin, taxifolin, apigenin, syringová ($\geq 95\%$, vše Sigma-Aldrich) a rutin ($\geq 94\%$, vše Sigma-Aldrich)

Ostatní

- acetonitril a methanol v čistotě pro HPLC-MS (Sigma-Aldrich), diethylether (p.a., Lach-Ner, Neratovice), kyselina mravenčí (čistota pro HPLC-MS), ethylacetát (p.a.) (PENTA, Česká republika),
- deionizovaná voda upravená pomocí čistícího zařízení Mili-Q (Merck Millipore, Německo), kyselina chlorovodíková (35%) (J.T.Baker, Nizozemsko)

Vzorky

Pro experimentální část bylo použito 22 vzorků medovin vyrobených včelaři nebo zakoupených v místních supermarketech (tabulka 1).

Tabulka 1: Vzorky medovin.

Číslo	Medovina	Výrobce	Způsob přípravy
1	Přibyslavská medovina, medovicová	Včelař, Nové město n. Metují, ČR	nevařená
2	Přibyslavská medovina, slunečnicová	Včelař, Nové město n. Metují, ČR	nevařená
3	Přibyslavská medovina, lípa	Včelař, Nové město n. Metují, ČR	nevařená
4	Medovina lípa	Včelař, Nové město n. Metují, ČR	nevařená
5	Medovina jarní	Včelař, Nové město n. Metují, ČR	nevařená
6	Medovina luční	Včelař, Nové město n. Metují, ČR	nevařená
7	Medové víno z Českého lesa s jablečnou příchutí (cyser)	Včelař, Domažlice, ČR	nevařená
8	Medové víno z Českého lesa, archivní	Včelař, Domažlice, ČR	nevařená
9	Medové víno z Českého lesa s rybízovou příchutí	Včelař, Domažlice, ČR	nevařená
10	Originální medovina z kunětických stráží	Včelař, Pardubice, ČR	nevařená
11	Domácí jemná medovina	Včelař, Břeclav, ČR	nevařená
12	BIO medovina	Obchod, Včelařství Sláma, ČR	nevařená
13	Medovina z Vysočiny	Obchod, Včelařství Sláma, ČR	nevařená
14	Staročeská medovina	Obchod, Včelařství Sláma, ČR	nevařená
15	Křivoklátská medovina	Obchod, Česká včela s.r.o., ČR	nevařená
16	Keltská medovina	Obchod, Sznapka, ČR	nevařená
17	Medové Velkomoravské	Obchod, NATUREL s.r.o., ČR	nevařená
18	Medovina Medvědí objetí	Obchod, Medovinka s.r.o., ČR	vařená

Číslo	Medovina	Výrobce	Způsob přípravy
19	Staroslovenská medovina	Obchod, Včela PRO, Slovakia	vařená
20	Včelovina	Obchod, Včelco s.r.o., Slovensko	nevařená
21	Tmavá staroslovenská medovina z lesního medu	Obchod, APIMED, Slovensko	nevařená
22	Slovenská originální medovina	Obchod, APIMED, Slovensko	nevařená

Pracovní postup

Příprava standardů

U medovin byly kalibrační roztoky jednotlivých fenolických látek připraveny postupným ředěním zásobního roztoku o koncentraci 1 g/l pomocí 20% (v/v) acetonitrilu. Rozsah koncentrací kalibračních roztoků byl 0,01 - 5 mg/l pro kyselinu 4-hydroxybenzoovou, gentisovou, chlorogenovou, salicylovou, kávovou, syringovou, gallovou a 3,4-dihydroxybenzaldehyd, rutin a epikatechin. Další koncentrační úroveň byla 0,002 - 1 mg/l pro kyselinu vanilovou, ferulovou, isoferulovou, 3,4-dihydroxybenzoovou, *p*-kumarovou a *m*-kumarovou, apigenin, katechin, myricetin, taxifolin, luteolin, vanilin a kvercetin.

Příprava vzorků

Extrakce fenolických látek byla provedena z jednotlivých vzorků medoviny (10 ml) za použití 30 ml směsi diethylether:ethylacetát (1:1) okyselené 150 µl 35% (m/m) kyseliny chlorovodíkové. Po 20 minutách třepání byla horní organická fáze přenesena do plastové kónické zkumavky, odpařena pod tekutým dusíkem do sucha a skladována při -18 °C až do analýzy. Před analýzou byl zbytek rozpuštěn ve 2 ml 50% (v/v) acetonitrilu, přefiltrován přes 0,45 µm PTFE stříkačkový filtr a zředěn 50krát 20% (v/v) acetonitrilem. Pro přímou analýzu medovin byly jednotlivé vzorky ředěny 10krát 20% (v/v) acetonitrilem a přefiltrovány.

Podmínky měření

Separace probíhala na koloně Ascentis Express C18 (délka 150 mm, průměr 3,0 mm, zrnitost 2,7 µm). Pro separaci byla zvolena teplota 30 °C. Mobilní fáze byla složena z redestilované vody okyselené 0,3 % (v/v) kyseliny mravenčí (A) a acetonitrilu (B). Průtok mobilní fáze byl 0,6 ml/min. Dávkované množství vzorku bylo 2 µl. Profil gradientové eluce je uveden v tabulce 2.

Tabulka 2: Gradientová eluce pro separaci medovin.

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

Optimalizace MS detekce v režimu monitorování vybraných reakcí byla provedena pomocí přímé infúze standardů fenolických látek do hmotnostního spektrometru. Byly snímány záporné ionty po ionizaci elektrosprejem (ESI-).

Hmotnostní spektrometr při přímé infúzi pracoval za následujících podmínek:

Průtok 5–10 µl/min, ESI-, kolizní plyn – medium, napětí na kapiláře iontového zdroje -4500 V, vstupní potenciál -10 V, deklasterační potenciál – v závislosti na sloučenině (-60 V až -190 V). Průtoky plynů podílejících se na rozprášení a sušení eluátu: „curtain gas“ 10 psi, „ion gas 1“ 20 psi a „ion gas 2“ 0 psi.

Podmínky pro HPLC-MS:

Průtok 0,6 ml/min, ESI-, kolizní plyn – medium, teplota 400 °C, kolizní plyn -4500 V, vstupní potenciál -10 V, parametry – deklasterační potenciál (DP), MRM přechody, kolizní energie (CE) a výstupní potenciál kolizní cely (CXP) jsou uvedeny v diskusní části. Průtoky plynů podílejících se na rozprášení a sušení eluátu: „curtain gas“ 20 psi, „ion gas 1“ 40 psi a „ion gas 2“ 50 psi.

1.6.2 Pohanka

Přístroje a zařízení

Fenolické látky byly analyzovány s využitím kapalinového chromatografu ve spojení s hmotnostním spektrometrem QTRAP 4500 (AB SCIEX, Framingham USA). Kapalinový chromatograf obsahoval 2 čerpadla mobilní fáze LC-20AD, směšovač mobilní fáze, autosampler SIL-20 A (vše Shimadzu, Kyoto, Japonsko) a termostat kolon LCO 102 single (Ecom, Praha).

Měření antioxidační aktivity metodou ABTS a DPPH a celkového množství fenolických látek bylo provedeno pomocí spektrofotometru Shimadzu UV-2450 (Kyoto, Japonsko) s využitím kvivety S/G10 optické délky 10 mm (Fisher Scientific, Německo).

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). Vzorek pohankových zrn byl rozemlet pomocí nožového mlýnu GRINDOMIX GM 200 (Retsch, Česká republika) a zhomogenizován prosetím přes síto o velikosti pórů 0,5 mm. K extrakci vzorků byla použita třepačka REAX 2 (Heidolph, Německo) a ultrazvuková vana K-12LE (Kraintek, Česká republika). K urychlení sedimentace byla použita centrifuga Universal 320 (Hettich, Německo). Vzorky byly odpařovány s využitím sušící vany (Miulab, Čína) s přívodem dusíku. Dále byl použit pH-metr (Methrom 827, Švýcarsko), magnetické míchadlo s ohřevem MR 2002 (Heidolph, Německo) a sušárna (Carbolite Apex AX 120). Přechištění bylo provedeno pomocí stříkačkových polytetrafluorethylenových (PTFE) filtrů o velikosti pórů 0,45 μm (Labicom, Česká republika).

Použité chemikálie

Standardy

- kyselina *p*-kumarová, *m*-kumarová, kávová, epikatechin, isokvercitrin, naringenin, 7-hydroxyflavon (vše $\geq 98\%$), chlorogenová ($\geq 99\%$), 3,4-dihydroxybenzoová, 4-hydroxybenzoová, katechin, orientin, hyperosid (vše $\geq 97\%$), syringová, kaempferol, kvercetin, kvercitrin, vitexin (vše $\geq 95\%$) a rutin ($\geq 94\%$, vše Sigma-Aldrich)

Ostatní

- methanol čistoty pro HPLC-MS (Sigma-Aldrich)
- DPPH (1,1'-difenyl-2-pikrylhydrazyl) ($\geq 90\%$, Sigma-Aldrich), FCM (Folin-Ciocalteuovo činidlo) ($c=2\text{mol/l}$, Sigma-Aldrich), ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát) ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich), Trolox ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich)
- aceton (p.a.) (Lach-Ner, Neratovice)
- kyselina mravenčí (98 %) (PENTA, Česká republika)
- deionizovaná voda upravená pomocí čistícího zařízení Mili-Q (Merck Millipore, Německo)
- bezvodý uhličitan sodný (p.a.) a kyselina chlorovodíková (35 %) (J.T.Baker, Nizozemsko)
- peroxidisíran draselný (98 %) (Lachema, Neratovice, ČR)
- *n*-hexan (95 %) (Lab-Scan, Polsko)

Vzorky

Pro analýzu fenolických látek byla použita mechanicky loupaná pohanka Kroupa a Lámanka (Pohankový mlýn Šmajstrla, Česká republika).

Pracovní postup

Příprava standardů

Kalibrační roztoky jednotlivých fenolických látek byly připraveny postupným ředěním zásobního roztoku o koncentraci 1 g/l pomocí 50% (v/v) methanolu. Rozsah koncentrací kalibračních roztoků byl 0,002 – 5 µg/l pro všechny standardy (chlorogenová, kávová, 3,4-dihydroxybenzoová, 4-hydroxybenzoová, syringová, *p*-kumarová a *m*-kumarová kyselina, epikatechin, katechin, kvercetin, kvercitrin, hyperosid, rutin, vitexin, orientin, isokvercitrin, naringenin, kaempferol a 7-hydroxyflavon).

Příprava vzorků

Z namletého vzorku pohanky byly odebrány a naváženy 2 gramy. Pro odstranění tuků se k naváženému množství přidalo 15 ml hexanu a celá směs byla třepána 15 minut pomocí laboratorní třepačky. Následně byla odstraněna kapalná fáze, do které se vyextrahovaly lipofilní látky. Celý tento proces byl opakován třikrát. Extrakce fenolických látek byla provedena třikrát za použití 20 ml 70% acetonu (v/v). Po 20 minutách třepání byla horní organická fáze přenesena do plastové kónické zkumavky. Extrakty byly odpařeny pod tekutým dusíkem do sucha a skladovány při -18 °C až do analýzy. Před analýzou byl zbytek rozpuštěn ve 2 ml 50% (v/v) methanolu, přefiltrován přes 0,45 µm PTFE stříkačkové filtry a před analýzou zředěn 1:1 50% (v/v) methanolem.

Podmínky měření

Separace probíhala na koloně Ascentis Express C18 (délka 150 mm, průměr 3,0 mm, zrnitost 2,7 µm). Pro separaci byla zvolena teplota 40 °C. Mobilní fáze byla složena z redestilované vody okyselené 0,3 % (v/v) kyseliny mravenčí (A) a methanolu (B). Průtok mobilní fáze byl 0,5 ml/min a dávkované množství vzorku 2 µl. Profil gradientové eluce je uveden v tabulce 3.

Tabulka 3: Gradientová eluce pro separaci pohanky.

Čas [min]	Koncentrace methanolu [%]
0	10
9	50
14	100
15	10

Optimalizace MS detekce a podmínky hmotnostního spektrometru při přímé infúzi byly stejné jako u medovin (kapitola 1.6.1 Podmínky měření). V případě podmínek pro HPLC-MS se lišil pouze průtok, který byl 0,5 ml/min.

1.6.3 Amarant

Přístroje a zařízení

Fenolické látky byly analyzovány s využitím kapalinového chromatografu ve spojení s hmotnostním spektrometrem QTRAP 4500 (AB SCIEX, Framingham USA). Kapalinový chromatograf obsahoval 2 čerpadla mobilní fáze LC-20AD, směšovač mobilní fáze, autosampler SIL-20 A (vše Shimadzu, Kyoto, Japonsko) a termostat kolon LCO 102 single (Ecom, Praha). Měření antioxidační aktivity metodou ABTS a celkového množství fenolických látek bylo provedeno pomocí spektrofotometru Shimadzu UV-2450 (Kyoto, Japonsko) s využitím kyvety S/G10 optické délky 10 mm (Fisher Scientific, Německo).

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). Vzorek amarantových zrn byl rozemlet pomocí nožového mlýnu GRINDOMIX GM 200 (Retsch, Česká republika) a zhomogenizován prosetím přes síto o velikosti pórů 0,5 mm. K extrakci vzorků byla použita třepačka REAX 2 (Heidolph, Německo) a ultrazvuková vana K-12LE (Kraintek, Česká republika). K urychlení sedimentace byla použita centrifuga Universal 320 (Hettich, Německo). Vzorky byly odpařovány pomocí sušicí vany (Miulab, Čína) s přívodem dusíku. Dále byl použit pH-metr (Methrom 827, Švýcarsko), magnetické míchadlo s ohřevem MR 2002 (Heidolph, Německo) a sušárna (Carbolite Apex AX 120). Přečištění bylo provedeno pomocí stříkačkových PTFE filtrů o velikosti pórů 0,45 μm (Labicom, Česká republika).

Použité chemikálie

Standardy

- *p*-kumarová, kávová (vše ≥ 98 %), 3,4-dihydroxybenzoová, 4-hydroxybenzoová, vanilová (vše ≥ 97 %), salicylová, ferulová (vše ≥ 99 %, vše Sigma Aldrich),
- kaempferol, kvercetin (vše ≥ 95 %), rutin (≥ 94 %, vše Sigma-Aldrich)

Ostatní

- methanol a acetonitril čistoty pro HPLC-MS, FCM (Folin-Ciocalteuovo činidlo, $c=2\text{mol/l}$), ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát, $\geq 98\%$), kyselina ethylendiaminotetraoctová, chloroform, kyselina L-askorbová (vše $\geq 99\%$) a Trolox ($\geq 98\%$) (vše Sigma-Aldrich),
- *n*-hexan (95%, Lab-Scan, Polsko), aceton (p.a.) a diethylether (p.a.) (Lach-Ner, Neratovice), hydroxid sodný (p.a.), kyselina mravenčí (98%), ethylacetát (p.a.), trihydrát octanu sodného (99,8%), kyselina octová (99,8%), dichlormethan (p.a.) (PENTA, Česká republika)
- deionizovaná voda upravená pomocí čistícího zařízení Mili-Q (Merck Millipore, Německo), bezvodý uhličitan sodný (98%) a kyselina chlorovodíková (35%) (J.T.Baker, Nizozemsko), peroxodisíran draselný, (p.a.) (Lachema, Neratovice, ČR)

Vzorky

Pro analýzu fenolických látek byl použit vzorek 100% amarantového zrna (Zdraví z přírody, Indie).

Příprava standardů

Kalibrační roztoky jednotlivých fenolických látek byly připraveny postupným ředěním zásobního roztoku o koncentraci 1 g/l pomocí 50% (v/v) methanolu. Rozsah koncentrací kalibračních roztoků byl 0,003 – 4 $\mu\text{g/l}$ pro všechny standardy (kávová, 3,4-dihydroxybenzoová, 4-hydroxybenzoová, vanilová, salicylová, ferulová a *p*-kumarová kyselina, kvercetin, rutin a kaempferol).

Příprava vzorků

Pro odtranění lipofilních látek byl použit stejný postup jako u pohanky (viz kapitola 1.6.2). Následně byl vzorek vysušen pod tekutým dusíkem.

Alkalická hydrolyza a extrakce vázaných fenolických látek

K upravenému vysušenému vzorku bylo přidáno 15 ml 4M NaOH, 87,6 mg EDTA a 300 mg kyseliny askorbové. Reakční směs byla umístěna do třepačky, kde byla ponechána 4 hodiny při laboratorní teplotě. Následně byla směs okyselena pomocí 35% (m/m) HCl na pH 2 a extrahována 20 ml směsí diethylether a ethylacetát v poměru 1:1 (v/v) po dobu 15 minut. Extrakce byla provedena třikrát. Vrchní organická vrstva byla oddělena a vysušena pod proudem dusíku.

Kyselá hydrolýza a extrakce vázaných fenolických látek

Ke vzorku bylo přidáno 15 ml 1M HCl a směs byla umístěna na 45 minut do vodní lázně o teplotě 90 °C. Vychlazená směs byla poté třikrát extrahována 20 ml extrakční směsí diethylether a ethylacetát v poměru 1:1 (v/v) po dobu 15 minut. Vrchní organická vrstva byla oddělena, vysušena a uskladněna.

Extrakce volných fenolických látek

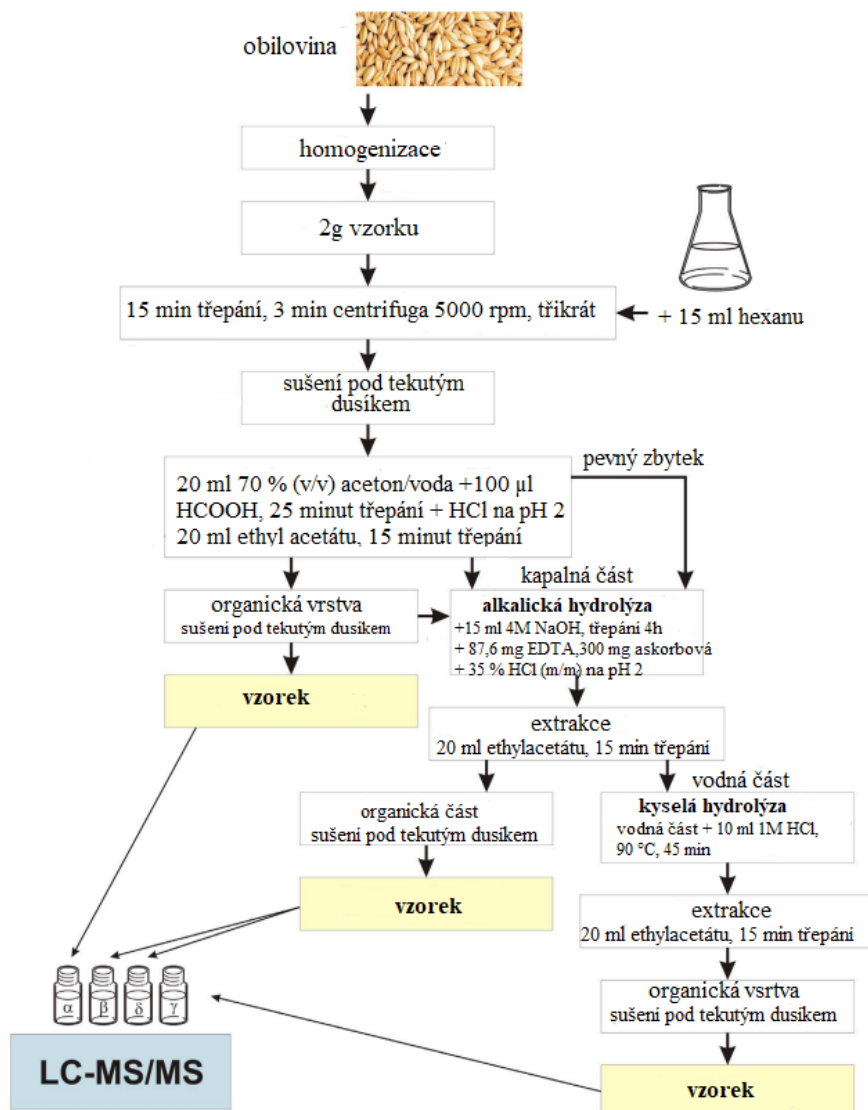
Extrakce volných fenolických látek byla provedena několika různými rozpouštědly s cílem zjistit, které je pro cílové fenolické látky nejvhodnější (tabulka 4). Dále byl testován vliv přidavku kyseliny mravenčí do extrakčního rozpouštědla na výtěžek extrakce. Jednotlivé kapalně extrakty byly odděleny od pevného vzorku pomocí centrifugy (5 minut, 5000 rpm). Extrakce byla provedena celkem třikrát a kapalně fáze byly převedeny do centrifugační zkumavky. Rozpouštědlo bylo odpařeno pod dusíkem a odparky byly uchovávány v lednici až do analýzy. Každý extrakt byl připraven dvakrát.

Tabulka 4: Souhrn jednotlivých provedených extrakcí.

Značení	Extrakční činidlo I	Způsob a doba extrakce	Extrakční činidlo II	Způsob a doba extrakce
E1	70% methanol + HCOOH	25 minut třepání	-	-
E2	80% methanol	25 minut třepání	-	-
E3	80% methanol + HCOOH	25 minut třepání	-	-
E4	80% methanol + HCOOH	25 minut v ultrazvukové lázni	-	-
E5	70% aceton	25 minut třepání	-	-
E6	70% aceton + HCOOH	25 minut třepání	-	-
E7	70% aceton + HCOOH	25 minut v ultrazvukové lázni	-	-
E8	70% aceton	25 minut třepání	diethylether a ethylacetát (1:1)	15 minut třepání
E9	70% aceton + HCOOH	25 minut třepání	diethylether a ethylacetát (1:1)	15 minut třepání
E10	70% aceton + HCOOH	25 minut v ultrazvukové lázni	diethylether a ethylacetát (1:1)	15 minut třepání

Postupná extrakce volných a vázaných fenolických látek

Na obrázku 15 je zobrazen schématický postup extrakce volných a vázaných fenolických látek, který byl převzat z publikace [210], kde byla tato postupná extrakce aplikována na ječmen. Vzhledem k tomu, že ječmen i amarant patří mezi obiloviny, byla úspěšně vyzkoušena implementace tohoto postupu právě na amarant [210]. Nejprve byly extrahovány volné fenolické kyseliny pomocí 20 ml 70% (v/v) acetonu, ke kterému bylo přidáno 100 μ l HCOOH. Po 25 minutách třepání v laboratorní třepačce byla kapalná část ze třech opakování okyselena koncentrovanou HCl na pH 2 a následovala extrakce 20 ml směsí diethyletheru a ethylacetátu (1:1), která byla třepána v laboratorní třepačce po dobu 15 minut. Vzniklá organická vrstva byla oddělena a převedena do centrifugační zkumavky. Vodný podíl byl dále podroben alkalické hydrolyze a následovala extrakce diethyletherem a ethylacetátem. Posledním krokem byla kyselá hydrolyza vodného podílu vzniklého z předchozího kroku a její následná extrakce směsí diethyletheru a ethylacetátu. Zbýlý pevný podíl (po extrakci 70% acetonem) byl podroben alkalické hydrolyze a extrahován stejným způsobem jako je popsáno v předchozí kapitole. Všechny jednotlivé extrakce byly provedeny třikrát. Výsledné extrakty pak byly umístěny do centrifugačních zkumavek a sušeny pod proudem dusíku. Vzorky byly skladovány v lednici až do analýzy.



Obrázek 15: Postupná extrakce volných a vázaných fenolických kyselin [210].

Podmínky měření

Separace probíhala na koloně Ascentis Express C18 (délka 150 mm, průměr 3,0 mm, zrnitost 2,7 μm). Mobilní fáze byla složena z redestilované vody okyselené 0,3 % (v/v) kyseliny mravenčí (A) a acetonitrilu (B). Průtok mobilní fáze byl 0,4 ml/min, teplota 40 °C a dávkované množství vzorku 2 μl . Pro separaci byl použit gradient, který je znázorněn v tabulce 5.

Tabulka 5: Gradientová eluce pro separaci amarantu.

Čas [min]	Koncentrace acetonitril [%]
0	10
6	37
7	100
9	10

Optimalizace MS detekce a podmínky hmotnostního spektrometru při přímé infúzi byly stejné jako u medovin a pohanky (kapitola 1.6.1 Podmínky měření). V případě podmínek pro HPLC-MS se lišil pouze průtok, který byl 0,4 ml/min.

Spektrofotometrické metody

Antioxidační aktivita a celkový obsah fenolických látek byl měřen u vzorků pohanky pomocí ABTS, DPPH a FCM a u vzorků amarantu pomocí ABTS a FCM.

Metoda ABTS

Tableta ABTS (10 mg) byla rozpuštěna v 5 ml destilované vody ($c = 3,6$ mmol/l) a smíchána se 100 μ l roztoku $K_2S_2O_8$ (0,064 mol/l). Roztok byl ponechán v ledničce bez přístupu světla po dobu 12–16 hodin. Poté bylo z tohoto roztoku odebráno 2,5 ml do 100 ml odměrné baňky a doplněno destilovanou vodou po rysku.

U amarantu bylo nutné ředit ABTS zásobní roztok octanovým pufrem (pH=4,3) z důvodu zakalení roztoku. Pro měření celkové antioxidační aktivity byl poté zásobní roztok ABTS zředěn acetátovým pufrem tak, aby jeho absorbance byla cca 0,8.

Ke 3 ml tmavě modrozeleného roztoku ABTS bylo pipetováno vhodné množství extraktu. U pohanky to bylo 10 μ l (3krát zředěného extraktu) a pro amarant 100 μ l. Výsledná reakční směs byla důkladně promíchána a ponechána bez přístupu světla. Po 10 minutách byl změřen úbytek absorbance při vlnové délce 734 nm. Úbytek absorbance byl vyjádřen v procentech a pomocí rovnice regrese kalibrační křivky přepočten na ekvivalentní množství Troloxu.

Metoda DPPH

Na analytických vahách bylo naváženo vypočtené množství DPPH a doplněno do odměrné baňky methanolem na výslednou koncentraci $c = 0,1$ mmol/l. Ke 3 ml tohoto roztoku bylo přidáno 30 μ l 3x zředěného extraktu pohanky. Reakční směs byla ponechána

bez přístupu světla 30 minut. Při této době došlo ke změně barvy původního fialového roztoku na světle fialový. Tento pokles byl monitorován při vlnové délce 515 nm. Úbytek absorbance byl pomocí kalibrační křivky přepočítán na ekvivalentní množství Troloxu.

Metoda FCM

Pro stanovení celkového množství fenolických látek u pseudoobilovinových zrn byl připraven pracovní roztok, který vznikl ze 2M Folin-Ciocalteuového činidla a deionizované vody v poměru 1:20 (v/v). Ke 2 ml pracovního roztoku bylo přidáno vhodné množství extraktu vzorku (100 μ l amarant a 50 μ l 3x zředěného extraktu). Po 5 minutách byl přidán 1 ml 7,5% roztoku Na_2CO_3 . Reakční směs byla uchována v klidu bez přístupu světla po dobu 35 minut. Po této době byl změřen nárůst absorbance při vlnové délce 750 nm. Pomocí kalibrační křivky byl přepočítán nárůst absorbance na ekvivalentní množství kyseliny gallové.

Statistické zpracování experimentálních dat

Pro zpracování dat byly využity jednorozměrné i vícerozměrné statistické metody. Ve statistickém programu QC Expert 2.5 (Trilobyte) byly vytvořeny rovnice regrese všech kalibračních křivek. Pro veškeré testy bylo využito analýzy rozptylu na hladině významnosti 95 % ($\alpha = 0,05$), kde došlo k odstranění vlivných bodů pomocí Pregibonova, Williamsova, McCulloh-Meterova a L-R grafu. Významnost regresních parametrů byla testována na základě Studentova t-testu. Analýza hlavních komponent (PCA) byla vyhodnocena v programu Statistika 12 (Statsoft, Inc. Tulsa, OK, USA). PCA vyjadřuje vzájemný vztah objektů, kde ty, které se nachází blízko u sebe, jsou si podobné a objekty daleko od sebe jsou odlišné. Pokud jsou objekty výrazně odlehlé, nazýváme je „outliery“.

1.7 VÝSLEDKY A DISKUSE

1.7.1 Medoviny

Optimalizace HPLC a HPLC/MS

Nejprve byly optimalizovány podmínky, jako je složení mobilní fáze (koncentrace kyseliny mravenčí v mobilní fázi a počáteční koncentrace acetonitrilu), gradientová eluce a stacionární fáze s cílem dosáhnout maximální rychlosti separace a minimální koeluce. Jako organická složka mobilní fáze byl vybrán acetonitril z důvodu lepšího tvaru píku a vyšší účinnosti separace ve srovnání s methanolem. Počáteční koncentrace acetonitrilu byla zvolena tak, aby nejméně zadržovaná kyselina gallová eluovala přibližně minutu za mrtvým objemem kolony, aby bylo možné eliminovat polární látky z matrice, které by měly vliv na MS analýzu. První minuta separace byla tedy nastavena do odpadu. Kvůli velkému zpoždění gradientu u použitého systému byla upřednostněna skoková změna koncentrace mobilní fáze pro zrychlení eluce látek, které se separují až po kyselině gallové. Optimální eluce vybraných fenolických látek bylo dosaženo za pomoci gradientové eluce s průběhem gradientu, který je uveden v tabulce 2 v experimentální části. Separace všech látek byla uskutečněna do 6 minut. Retenční časy jednotlivých fenolických látek jsou uvedeny v tabulce 6.

Pro detekci byl využit hmotnostní spektrometr Q-TRAP 4500 v MRM režimu. Nejprve byly optimalizovány jednotlivé parametry, jako je DP, CE a CXP. Pro každou látku byl optimalizován a vybrán jeden MRM přechod. Optimalizované parametry pro kvantitativní účely jednotlivých vzorků medovin jsou uvedeny v tabulce 6.

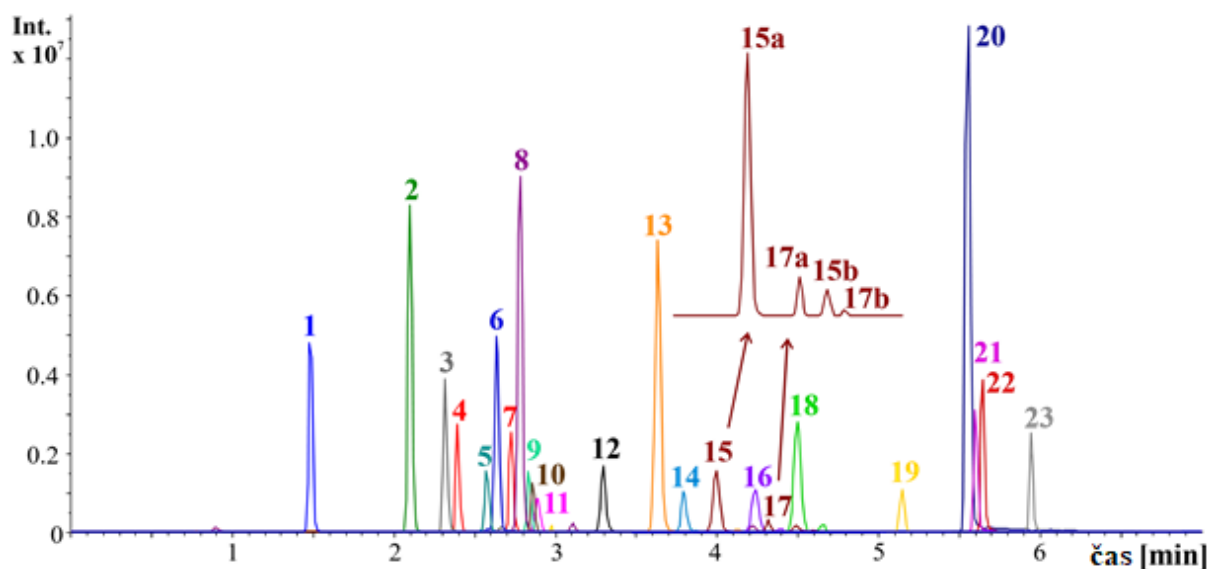
Tabulka 6: Optimalizované parametry pro MS/MS analýzu medovin.

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
Gallová kyselina	1	1,56	168,70	124,90	-80	-20	-9
3,4-dihydroxybenzoová kyselina	2	2,19	152,90	108,97	-70	-22	-9
Chlorogenová kyselina	3	2,43	352,80	190,80	-60	-30	-9
Katechin	4	2,53	288,80	244,90	-110	-24	-9
3,4-dihydroxybenzaldehyd	5	2,71	136,80	107,90	-90	-30	-9
4-hydroxybenzoová kyselina	6	2,76	136,85	92,90	-5	-24	-7
Epikatechin	7	2,88	288,85	244,91	-95	-22	-7
Kávová kyselina	8	2,92	178,80	134,90	-80	-22	-9
Vanilová kyselina	9	2,98	166,90	107,90	-60	-30	-9
Syringová kyselina	10	3,00	196,90	122,90	-75	-32	-8

Látka	značení	Čas min	Q1 m/z	Q3 m/z	DP V	CE V	CXP V
Gentisová kyselina	11	3,04	152,80	107,90	-50	-30	-9
Rutin	12	3,53	608,80	299,80	-130	-50	-5
<i>p</i> -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
<i>m,o</i> -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

Na obrázku 16 je zobrazená optimalizovaná separace látek. Optimalizace byla zaměřena především na separaci látek s podobnou strukturou, které mají stejnou molekulovou hmotnost a také stejné fragmentační chování, tudíž jejich optimalizované MRM přechody jsou totožné. Největším problémem bylo rozdělení čtyř isomerů kyseliny ferulové (horní část obrázku 15), které právě měly stejné MRM přechody, a navíc eluovaly i blízko u sebe. Kyselina ferulová se může z hlediska své struktury nacházet v *cis* a *trans* konfiguraci. Navíc se může ještě dále lišit absolutní konfigurací skupin navázaných na dvojnou vazbu. Proto jsou na obrázku vidět celkem čtyři píky příslušející *cis*, resp. *trans* isomerům, vždy v páru podle absolutní konfigurace.



Obrázek 16: Optimalizovaná chromatografická separace monitorovaných standardů. (1–gallová kyselina, 2–3,4-DHB, 3–chlorogenová kyselina, 4–katechin, 5–dihydroxybenzaldehyd, 6–4-HBA, 7–epikatechin 8–káвовá kyselina, 9–vanilová kyselina, 10–syringová kyselina, 11–gentisová kyselina, 12–rutin, 13–*p*-kumarová kyselina, 14–vanilin, 15–kyselina isoferulová (A-*trans*, B-*cis*), 16–taxifolin, 17–ferulová kyselina (A-*trans*, B-*cis*), 18–*m*-kumarová kyselina, 19–myricetin, 20–salicylová kyselina, 21–luteolin, 22–kvercetin, 23–apigenin)

Kvantifikace fenolických látek

Kvantitativní analýza byla provedena pomocí metody vnějšího standardu – prostřednictvím kalibrační křivky. Vybrané kalibrační roztoky byly změřeny celkem dvakrát na deseti koncentračních hladinách. Jednotlivé kalibrační parametry jsou spolu s vypočtenými směrodatnými odchylkami uvedeny v tabulce 7, kde lze najít i koeficient determinace (R^2), mez detekce (LOD) a stanovitelnosti (LOQ), které byly stanoveny jako trojnásobek a desetinásobek odstupe signálu od šumu. Výsledná koncentrace sledovaných sloučenin obsažených ve studovaných vzorcích medovin je uvedena v příloze (tabulka P1). Pro zjištění opakovatelnosti byly dva vzorky medovin analyzovány 8krát a relativní směrodatná odchylka byla v obou případech menší než 1 %.

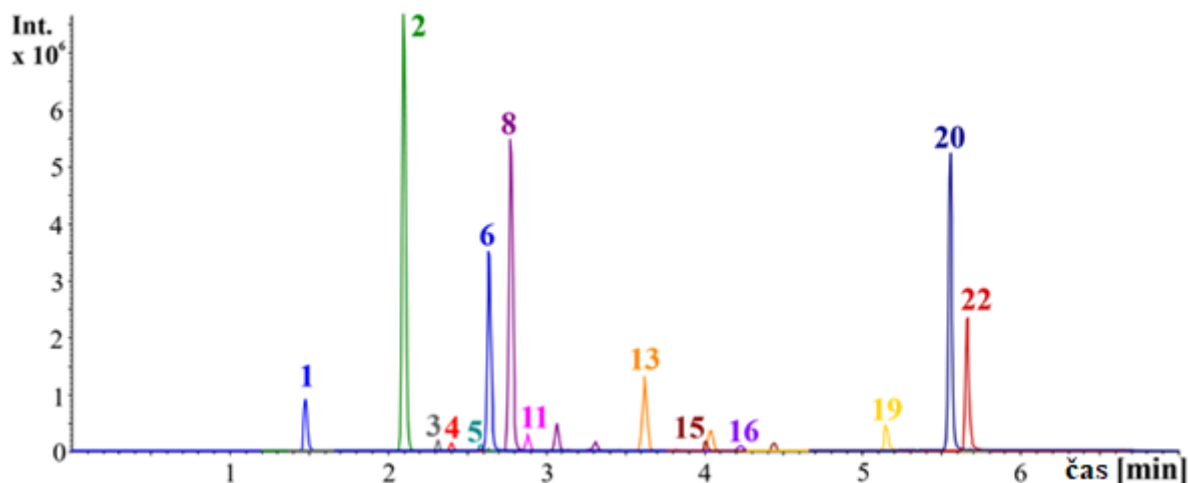
Tabulka 7: Regresní parametry, meze detekce a meze stanovitelnosti pro jednotlivé fenolické látky.

Látka	LOD [ng/ml]	LOQ [ng/ml]	Směrnice	Úsek	R^2
Gallová kyselina	0,714	5,714	760000 ± 8000	-20000 ± 2166	0,9984
3,4-DHB	0,387	1,290	170000 ± 11469	-3000 ± 2613 *	0,9994
Chlorogenová kyselina	2,000	6,666	380000 ± 6313	-7000 ± 6366 *	0,9962
Katechin	2,800	9,333	100000 ± 1300	-200 ± 338 *	0,9973
3,4-DHBA	3,031	10,10	240000 ± 3195	20000 ± 4039 *	0,9972
4-HBA	11,90	39,69	800000 ± 15947	50000 ± 16081 *	0,9946
Epikatechin	14,28	47,61	130000 ± 1491	-6000 ± 1863	0,9980
Kávová kyselina	4,489	14,96	2800000 ± 37176	90000 ± 47001*	0,9971
Vanilová kys.	2,589	8,630	6100 ± 53	400 ± 11	0,9996
Syringová kys.	19,44	64,81	7000 ± 153	-20 ± 154 *	0,9931
Gentisová kys.	0,517	1,709	2500 ± 54	-2000 ± 551	0,9934
Rutin	4,569	15,22	260000 ± 4370	-9000 ± 4406 *	0,9961
p-kumarová kys.	2,719	9,065	2300000 ± 45292	-20000 ± 9134 *	0,9946
Vanilin	7,352	24,48	87000± 448	30 ± 120 *	0,9996
Ferulová kys.	11,83	39,44	80000 ± 1120	-2000 ± 1129 *	0,9974
Taxifolin	10,25	34,19	390000 ± 1103	3000 ± 1257	0,9989
m-kumarová kys.	5,014	16,71	1200000 ± 23825	-7000 ± 4805 *	0,9943
Isoferulová kys.	3,120	10,40	70000 ± 615	-400 ± 165 *	0,9989
Myricetin	9,454	31,51	6000 ± 221	30 ± 12	0,9911
Salicylová kys.	0,469	1,563	11000000 ± 143053	-40000 ± 36171 *	0,9972
Luteolin	0,960	3,200	330000 ± 3741	900 ± 2605	0,9980
Kvercetin	0,686	2,286	1800000 ± 27181	-140000± 5478	0,9986
Apigenin	0,124	0,412	220000 ± 3223	14000 ± 2711	0,9983

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

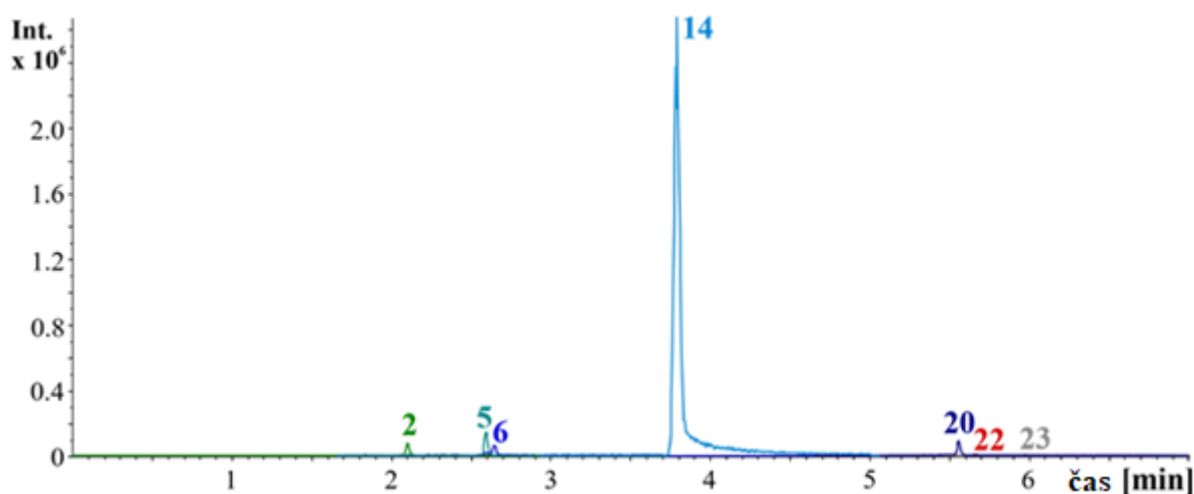
Z monitorovaných sloučenin byly ve studovaných vzorcích zastoupeny zejména kyseliny 3,4-dihydroxybenzoová, 4-hydroxybenzoová, kávová, *p*-kumarová a salicylová. V menší míře byly pozorovány kyselina ferulová, chlorogenová, gallová a gentisová spolu s dihydroxybenzaldehydem, apigeninem a kvercetinem. Naopak syringová a vanilová kyselina, rutin, taxifolin a myricetin nebyly přítomny v koncentracích nad LOQ.

Fenolický profil byl významně ovlivněn technologickým postupem a typem medu, ze kterého se medovina připravuje. Příkladem je vzorek č. 9 (medové víno, včelař) a č. 15 (medovina, obchod), které jsou znázorněny na obrázku 17 a 18. Medoviny s ovocnou příchutí (č. 7 a 9) se vyznačovaly mírně odlišným fenolickým profilem, který byl způsoben právě sloučeninami pocházejícími z ovoce. Dále byl identifikován fenethylester kyseliny kávové (vzorky č. 2-4 od stejného včelaře), který je hlavní sloučeninou propolisu. Je pravděpodobné, že při výrobě medoviny byl vymyt med z medové plástve, a proto se v medovině nacházeli i stopy propolisu. Vysoké množství kyseliny salicylové bylo nalezeno ve vzorcích připravených z lesních (medovicových) medů (č. 1,5,6,8,9,10,12,13 a 14). Ve srovnání s medovinami zakoupenými v místních obchodních sítích obsahovala medovina připravená od včelařů všeobecně vyšší celkovou koncentraci fenolických látek. Nejnižší celková koncentrace fenolických látek 1,81 a 1,23 mg/l (bez vanilinu) byla nalezena ve vzorcích č. 15, respektive č. 19 (Příloha 1), což může být způsobeno použitím nekvalitního medu nebo jeho nedostatečným množstvím při výrobě medoviny. Takto nízká koncentrace mohla být způsobena i tím, že se jedná o vařené medoviny (nebo se med zahříval před inokulací), což může mít vliv na degradaci některých cenných bioaktivních sloučenin. Ve vzorku č. 15 byla navíc zjištěna i mnohonásobně vyšší koncentrace vanilinu než u ostatních monitorovaných látek (obrázek 18). Vanilin se totiž často používá jako ochucovadlo. Kromě vzorku č. 15 byl vanilin nalezen i v dalších vzorcích (č. 13,14,18,21 a 22), ale v koncentraci o jeden řád nižší než u vzorku č. 15.



Obrázek 17: Chromatografická separace fenolických látek obsažených v extraktech ze vzorku medoviny č. 9.

(1–gallová kyselina, 2–3,4-DHB, 3–chlorogenová kyselina, 4–katechin, 5–dihydroxybenzaldehyd, 6–4-HBA, 8–káвовá kyselina, 11–gentisová kyselina, 13–*p*-kumarová kyselina, 15–ferulová kyselina, 16–taxifolin, 19–myricetin, 20–salicylová kyselina, 22–kvercetin)



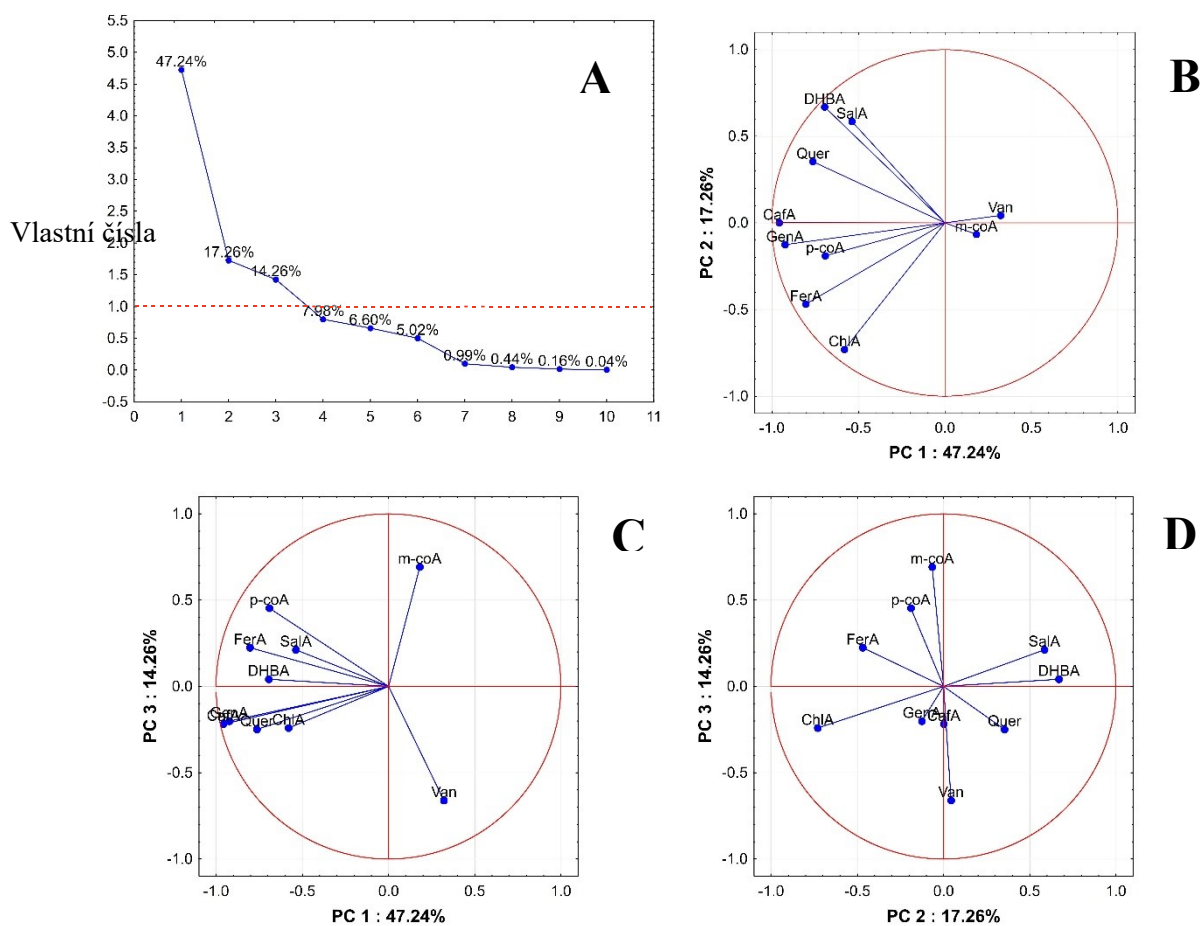
Obrázek 18: Chromatografická separace fenolických látek obsažených v extraktech ze vzorku medoviny č. 15.

(2–3,4-DHB, 5–dihydroxybenzaldehyd, 6–4-HBA, 14–vanilin, 20–salicylová kyselina, 22–kvercetin, 22–apigenin)

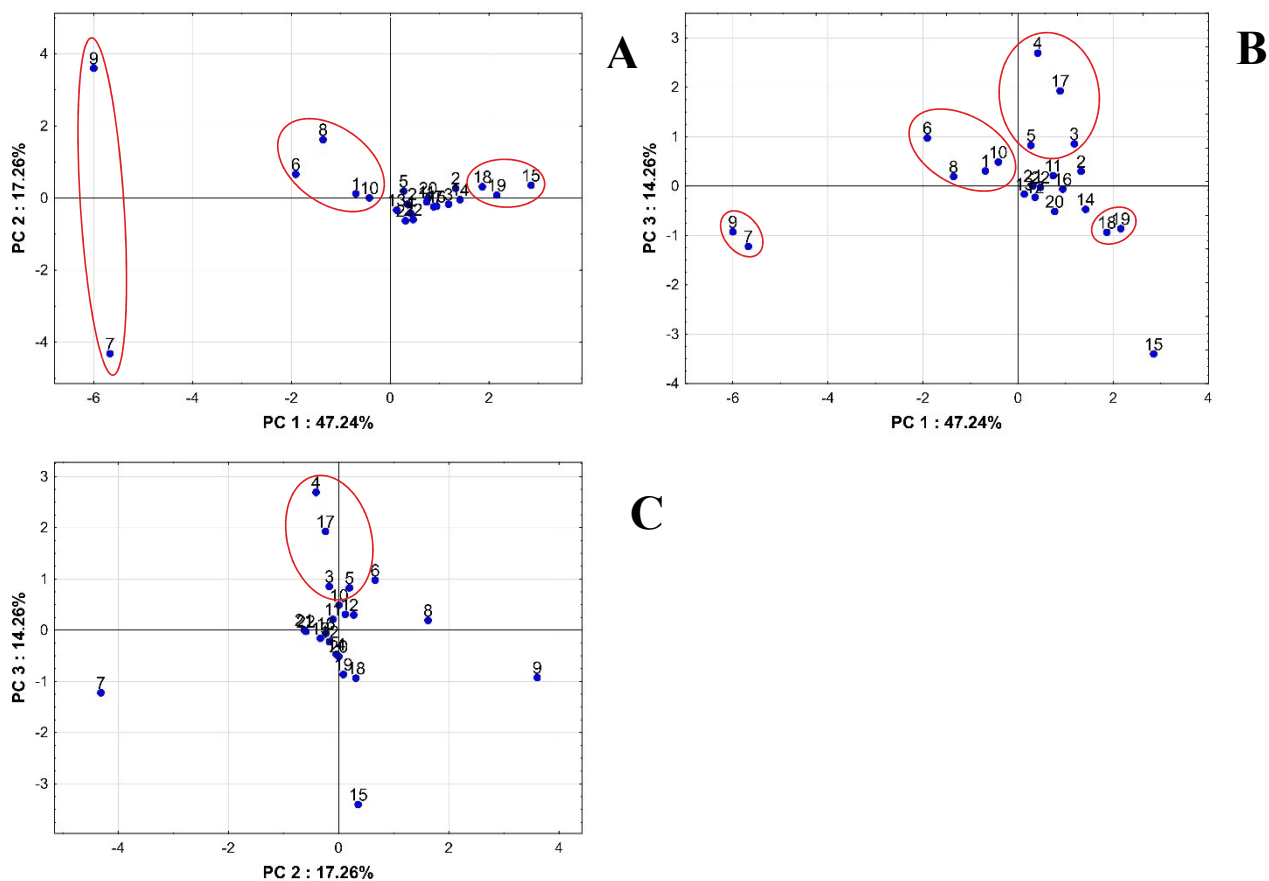
Hodnocení medovin s využitím vícerozměrné statistiky

Vzhledem k vysokému počtu monitorovaných sloučenin byla pro klasifikaci vybraných vzorků medoviny a popisu vztahu mezi jednotlivými vzorky použita analýza hlavních komponent. Nejprve byl pomocí této metody snížen vysoký počet proměnných (18 sloučenin), protože některé proměnné byly redundantní a významně neovlivňovaly popis systému. Pro popis systému bylo využito celkem 10 z 18 proměnných: kvercetin, vanilin, kyselina

3,4-dihydroxybenzoová, salicylová, kávová, gentisová, *p*-kumarová, ferulová, chlorogenová a *m*-kumarová. Grafy komponentních vah (PCAW) jsou společně se Sutinovým grafem zobrazeny na obrázku 19. Sutinový graf je sloupcovým diagramem vlastních čísel a určuje počet „užitečných“ hlavních komponent (PC). V tomto případě jsou nezbytné pro popis systému tři hlavní komponenty, které pokrývají 79 % celkového rozptylu (obrázek 19). PC1 souvisí s celkovým množstvím fenolických látek ve vzorcích medoviny, jelikož k němu téměř všechny vybrané proměnné více či méně přispívají (obrázek 19B). Vanilin a kyselina *m*-kumarová mají negativní korelaci, což znamená, že jejich příspěvek k PC1 je minimální, ale jsou důležité pro PC3 (obrázek 19C). Proměnné 3,4-dihydroxybenzoová, salicylová a chlorogenová kyselina a v menší míře i kvercetin, které jsou důležité pro PC2, určují typ medu nebo přídavek v podobě ovocné šťávy nebo bylin do medového roztoku před inokulací. Z rozptylového diagramu komponentního skóre (PCAS, obrázek 20) lze vzorky medoviny rozdělit do malých skupin podle koncentrace významných proměnných (fenolické látky), a tedy podle jejich podobnosti. Vzorky umístěné blízko u sebe jsou běžné vzorky, které se příliš neliší. Vzorky umístěné daleko od ostatních jsou extrémní nebo odlehle hodnoty, které se významně liší. Obecně platí, že vzorky medoviny umístěné na levé straně mají vyšší koncentraci fenolických látek ve srovnání se vzorky umístěnými na pravé straně grafu (obrázek 20A a 20B). Nejvyšší koncentrace fenolických látek mezi monitorovanými vzorky byla pozorována u dvou vzorků medoviny – medová vína (č. 7 a 9), která jsou umístěna na levé straně. Vzorky umístěné v horní části grafu PCAS (obrázek 20A) obsahují vyšší množství dihydroxybenzaldehydu (DHBA) kyseliny salicylové a kvercetinu (obrázek 19B). Vzorky č. 15, 18 a 19 obsahují velmi nízkou celkovou koncentraci fenolických látek, a proto jsou umístěny na pravé straně grafů (obrázek 20A a B). Vzorky č. 18 a 19 jsou vařené medoviny, což pravděpodobně způsobilo degradaci fenolických látek. Vzorek č. 15 je umístěn daleko od ostatních vzorků (obrázek 20B a C) ve směru vektoru vanilinu (obrázek 19 C a D). Lze tedy předpokládat, že tento vzorek nebyl připraven v souladu se správnou výrobní praxí a jedná se o falšovaný produkt [211].



Obrázek 19: Sutinový graf (A) popisuje systém prostřednictvím tří hlavních komponent pokrývajících 79 % celkového rozptylu a grafy komponentních vah (PCAW) B) PC 1 - PC 2, C) PC 1 - PC 3, D) PC 2 - PC 3 (STATISTICA, StatSoft), kde PC1 souvisí s celkovým množstvím fenolických látek ve vzorcích medoviny, PC 3 je ovlivněn negativní korelací vanilinu a kyseliny m-kumarové a PC 2 pomocí 3,4-dihydroxybenzoová, salicylová a chlorogenové kyseliny, určuje typ medu.



Obrázek 20: PCAS A) PC 1 - PC 2, B) PC 1 - PC 3, C) PC 2 - PC 3 (STATISTICA, StatSoft), rozčleňuje vzorky medoviny dle koncentrace fenolických látek, kde medoviny umístěné na levé straně mají vyšší koncentraci fenolických látek (vzorek č. 7 a 9) ve srovnání se vzorky umístěnými na pravé straně grafu (vzorky č. 15, 18 a 19). Vzorek č. 15 je umístěn daleko od ostatních vzorků a lze předpokládat, že nebyl připraven v souladu se správnou výrobní praxí.

1.7.2 Pohanka

Optimalizace HPLC a HPLC/MS

Nejprve byly testovány 3 oktadecylsilikagelové stacionární fáze (Ascentis Express C18, Kinetex Polar C18 a Kinetex PS C18). V případě modifikovaných C18 stacionárních fází (kolony Kinetex Polar a Kinetex PS), docházelo ke koelucím separovaných látek. Nejlepší volbou proto byla oktadecylsilikagelová kolona Ascentis Express C18 plněná povrchově porézními částicemi. Jako mobilní fáze byla využita směs methanolu a vody, která byla okyselená kyselinou mravenčí pro potlačení disociace fenolických kyselin. Dalšími optimalizovanými parametry byly podmínky gradientové eluce a teplota kolony (30 až 40 °C). Při 40 °C byla separační doba zkrácena a zároveň nedocházelo ke koeluci sledovaných látek. Optimální eluce vybraných fenolických látek bylo dosaženo za pomoci gradientové eluce s průběhem gradientu, který je uveden v tabulce 3 v experimentální části.

Pro detekci byl využit hmotnostní spektrometr v MRM režimu. Nejprve byly optimalizovány jednotlivé parametry, jako je DP, CE a CXP. Pro každou látku byl optimalizován a vybrán jeden MRM přechod. Optimalizované parametry pro kvantitativní účely jednotlivých vzorků jsou uvedeny v tabulce 8.

Tabulka 8: Optimalizované parametry pro MS/MS analýzu pohanky.

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
Hexóza kyseliny kávové	1	3,68	341	179	-90	-32	-5
3,4,dihydroxy-4-O-B-D-glukopyranosyl benzoová kys.	2	3,75	315	153	-100	-28	-6
4-hydroxybenzoová kys.	3	3,92	137	93	-55	-20	-5
3,4-dihydroxybenzoová kys.	4	4,00	153	109	-55	-20	-5
Hexóza kyseliny kávové	5	4,90	341	179	-90	-32	-5
Katechin	6	5,39	289	245	-95	-22	-7
5,4,7-trimetoxyflavan	7	5,80	299	137	-50	-18	-10
Katechin hexóza	8	5,95	451	289	-100	-22	-10
Chlorogenová kyselina	9	6,00	353	191	-95	-26	-5
Hexóza kyseliny kávové	10	6,10	341	179	-90	-32	-5
Prokyanidin B2-3-O-galát	11	6,37	729	407	-130	-40	-10
Prokyanidin trimer	12	6,54	865	289	-170	-54	-7
Swertiamakrosid	13	6,68	487	179	-130	-40	-5
Kávová kyselina	14	6,74	179	135	-70	-22	-7
Epiafzelechin-4,6-epikatechin	15	6,75	561	289	-130	-26	-7
3,4,dihydroxy-4-O-B-D-glukopyranosyl benzoová kys.	16	6,99	315	153	-100	-28	-6
Epikatechin	17	7,07	289	245	-100	-22	-9
Epiafzelechin-epiafzelechin-epikatechin	18	7,56	833	289	-130	-36	-6
Epiafzelechin-epikatechin-O-methyl-galát	19	7,88	727	289	-130	-38	-8
Epikatechin gallát	20	8,01	441	169	-100	-42	-12
<i>p</i> -kumarová kyselina	21	8,37	163	119	-45	-18	-9
Orientin	22	8,71	447	327	-125	-36	-11
Prokyanidin B2-dimetyl-galát	23	8,77	757	605	-130	-36	-6
Epikatechin-3-3-O-metyl galát	24	9,09	455	289	-100	-28	-10
Vitexin	25	9,35	431	283	-125	-44	-7
Epiafzelechin-4,6-epikatechin	26	9,41	561	289	-130	-26	-7
<i>m</i> -kumarová kyselina	27	9,54	163	119	-40	-20	-7
Rutin	28	10,17	609	300	-180	-48	-13
Isokvercitrin	29	10,21	463	300	-125	-36	-9
Hyperosid	30	10,25	463	300	-145	-40	-11
Epikatechin-O-3,4-dimetyl galát	31	10,37	469	319	-100	-28	-5
Kvercitrin	32	11,07	447	300	-130	-38	-7
Prokyanidin B	33	11,62	577	415	-170	-56	-8
Kvercetin	34	12,11	301	151	-110	-30	-3
Naringenin	35	12,25	271	151	-115	-26	-5
Dihydroxy-trimetoxyflavan	36	12,50	331	97	-90	-40	-10
7-hydroxyflavon	37	13,35	237	208	-130	-38	-9

Kvantifikace fenolických látek

Kvantitativní analýza byla provedena prostřednictvím metody vnějšího standardu – pomocí kalibrační křivky. Jednotlivé parametry pro všechny monitorované sloučeniny jsou uvedeny v tabulce 8. Koncentrace monitorovaných fenolických látek ve vzorcích pohanky jsou uvedeny v příloze tabulka P2. Regresní parametry lineárních závislostí ploch pod píkem na koncentraci látek (úsek a směrnice) jsou uvedeny v tabulce 9. Pro některé látky nebyl k dispozici příslušný standard, proto byly kvantifikovány na dostupné standardy (tabulka 10). Látky, pro které byl k dispozici autentický standard, nejsou v tabulce 10 uvedeny.

Tabulka 9: Meze detekce, meze stanovitelnosti, směrnice, úsek a koeficient determinace pro jednotlivé fenolické látky v pohance.

Látka	LOD [ng/ml]	LOQ [ng/ml]	Směrnice	Úsek	R ²
4-hydroxybenzoová kys.	0,73	2,43	2200 ± 24	60 ± 12	0,9994
Syringová kys.	8,55	28,5	11000 ± 2058	-300 ± 101	0,9982
<i>p</i> -kumarová kys.	6,74	22,4	1780000 ± 3195	-350 ± 67	0,9992
Rutin	6,15	20,5	275900 ± 271	-450 ± 17	0,9991
Katechin	1,31	4,36	215950 ± 46	-6 ± 1	0,9999
<i>m</i> -kumarová kys.	5,85	19,4	2900000 ± 14119	96000 ± 2036	0,9992
Kávová kys.	11,3	37,6	2955000 ± 2981	229000 ± 1833	0,9996
3,4-DHB	1,06	3,52	1840000 ± 3502	-8300 ± 414	0,9990
7-hydroxyflavon	0,32	1,06	700000 ± 5824	118000 ± 2995	0,9931
Chlorogenová kys.	4,89	16,3	392000 ± 4177	-300 ± 209	0,9986
Naringenin	0,45	1,51	1260000 ± 2336	232900 ± 562	0,9994
Epikatechin	1,04	3,46	256700 ± 408	17500 ± 923	0,9996
Kvercitrin	1,74	5,79	1114000 ± 12975	1200 ± 359	0,9989
Hyperosid	0,85	2,84	461000 ± 2679	3800 ± 128	0,9993
Vitexin	2,10	7,00	148000 ± 1809	220 ± 11	0,9991
Orientin	1,99	6,66	293000 ± 1443	5300 ± 274	0,9995
Isokvercitrin	0,98	3,26	814000 ± 4219	21000 ± 2138	0,9987
Kvercetin	2,01	6,69	1720000 ± 2439	19500 ± 107	0,9999

Tabulka 10: Kvantifikace vybraných fenolických látek v pohance na příslušné standardy.

Standard	Látka
Kávová kyselina	Hexóza kyseliny kávové a swertiamakrosid
3,4-DHB	3,4,dihydroxy-4-O-B-D-glukopyranosyl benzoová kyselina
Katechin	Katechin hexóza a prokyanidin trimer
7-hydroxyflavon	5,4,7-trimetoxyflavan a dihydroxy-trimetoxyflavan
Epikatechin	Prokyanidin B2-3-O-galát, epiafzelechin-4,6-epikatechin, epiafzelechin-epiafzelechin-epikatechin, epiafzelechin-epikatechin-O-metyl-galát, epikatechin galát, prokyanidin B2-dimetyl-galát, epikatechin-3-3-O-metyl galát, epikatechin-O-3,4-dimetyl galát a prokyanidin B

Celkem byly analyzovány dva vzorky pohankových zrn, a to Kroupa a Lámanka. Nejprve byly porovnány extrakty pohankových zrn a vliv klíčení. Z vybraných fenolických látek byly v obou vzorcích pohanky zastoupeny zejména kyseliny 3,4-dihydroxybenzoová, benzoová, *p*-kumarová a chlorogenová a hexóza kyseliny kávové. Z flavonoidů zde byl nejvyšší obsah rutinu, což odpovídá faktu, že pohanka by měla být jeho významným zdrojem. Naopak hyperosid, kvercitrin, isokvercitrin, kvercetin, 7-hydroxyflavon a kyselina kávová byly přítomny v nízkých koncentracích. Vyšší množství fenolických látek bylo nalezeno ve vzorku Lámanka, což může být způsobeno technologickým postupem výroby. Doba klíčení nemá skoro žádný vliv na uvolnění fenolických látek z vazby na buněčnou stěnu. Hodnoty jsou v průběhu jednotlivých dnů klíčení téměř stejné, takže je dostačující pohanku klíčit pouze jeden den. Ve srovnání s amarantem je pohanka významnějším zdrojem fenolických látek, a to především rutinu, což odpovídá skutečností uvedeným v publikacích [137,153,156]. Z hlediska produkce je důležité, že množství fenolických látek lze ovlivnit výběrem vhodné odrůdy. Pro dosažení vyššího množství fenolických látek je tedy vhodné vybírat odrůdy, které jsou známé jejich bohatým obsahem. Další vliv na obsah fenolických látek mohou mít i faktory jako je půda, podnebí a způsob zpracování (viz srovnání Kroupy a Lámanky). [148,152,156].

Spektrofotometrické metody

Antioxidační aktivita byla měřena u vzorků pohanky pomocí metod ABTS, DPPH a FCM.

- **ABTS a DPPH**

Nejdříve bylo důležité optimalizovat ředění a objem extraktů. Úbytek absorbance byl ve všech případech vypočítán podle následujícího vztahu:

$$\text{úbytek } A = \frac{A_{\text{blank}} - A}{A_{\text{blank}}} \cdot 100 \quad [\%]$$

kde A je absorbance vzorku v čase a A_{blank} je absorbance slepého pokusu. Reakční doba u ABTS byla 10 minut a v případě DPPH 30 minut.

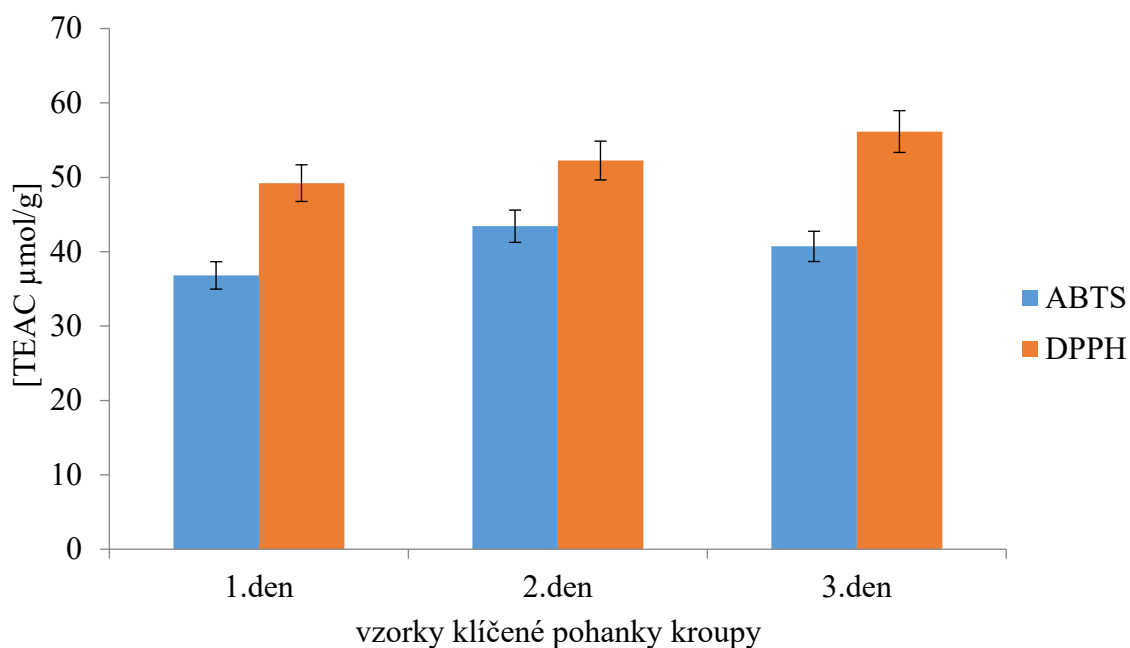
V průběhu třídenního klíčení byla u vzorků Kroupa a Lámanka měřena antioxidační aktivita volných fenolických látek. U každého vzorku byly odebrány dva podíly a každý z těchto vzorků byl změřen třikrát. Celkem bylo analyzováno 18 vzorků. Klíčení probíhalo za laboratorní teploty. Z každého vzorku bylo naváženo třikrát 100 g, které byly třikrát promyty vodou o teplotě 23 stupňů Celsia za použití síta. Zrna byla převedena do kádinek a zakryta navlhčeným filtračním papírem. Celá kádinka byla přikryta hodinovým sklíčkem. Následující den byly odebrány 4 gramy od každého vzorku, které byly rozmixovány ve 40 ml 70% (v/v) acetonu. Poté byla zrna opět třikrát promyta vodou se stejnými podmínkami jako předchozí den. Stejně jako u amarantu byl celkový obsah fenolických látek vyjádřen jako množství kyseliny gallové na jeden gram sušiny pohankových zrn. V případě ABTS bylo dávkováno 10 μ l (3krát ředěného) vzorku. Směs byla promíchána a ponechána 10 minut bez přístupu světla, poté byl změřen úbytek absorbance při vlnové délce 734 nm, který byl vztažen k slepému pokusu. Rovnice regrese kalibrační křivky v závislosti úbytku A na množství Troloxu v dávkovaném objemu byla $y = 994,39x + 1,2857$. Koeficient determinace byl 0,9989. V případě DPPH bylo dávkováno 30 μ l (3krát ředěného) vzorku. Směs byla promíchána a ponechána 30 minut bez přístupu světla, poté byl změřen úbytek absorbance při vlnové délce 515 nm, který byl vztažen k slepému pokusu. Rovnice regrese kalibrační křivky v závislosti úbytku A na množství Troloxu v dávkovaném objemu byla $y = 632,2x + 10,13$. Koeficient determinace byl 0,9912. Veškerá navážená množství byla přepočítána na sušinu (tabulka 11).

Tabulka 11: Množství vlhkosti během jednotlivých dní klíčení pohanky.

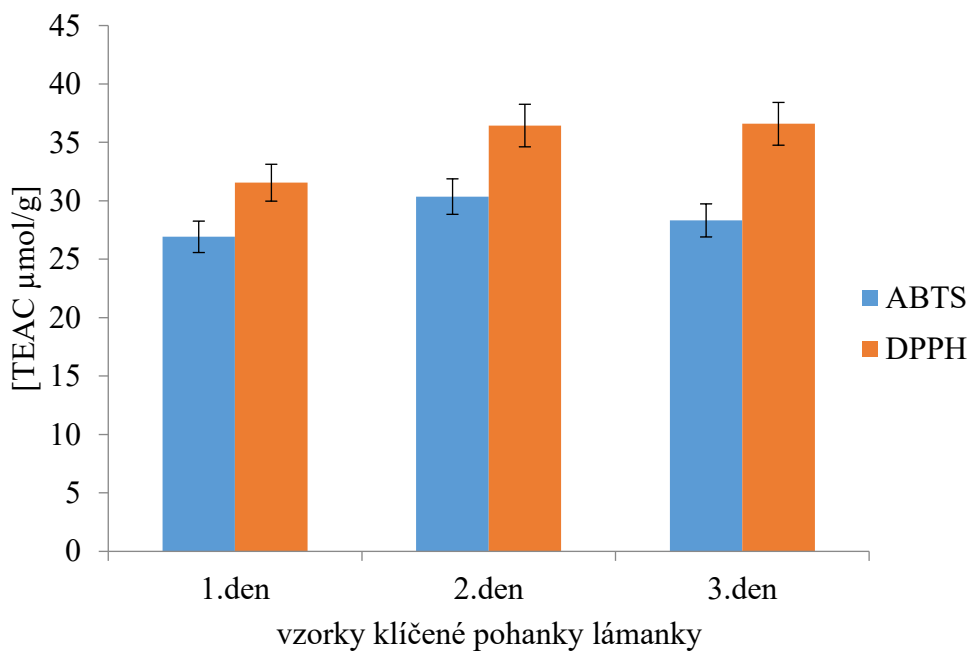
DEN KLÍČENÍ	KROUPA 1	KROUPA 2	KROUPA 3	LÁMANKA 1	LÁMANKA 2	LÁMANKA 3
1	42,44 %	44,25 %	47,58 %	40,69 %	41,66 %	43,65 %
2	46,58 %	46,63 %	43,83 %	47,32 %	49,74 %	47,80 %
3	43,17 %	44,28 %	41,07 %	47,57 %	50,58 %	45,41 %

Na obrázku 21 lze vidět hodnoty TEAC pro vzorek Kroupa, který vykazuje vyšší antioxidační účinky ve srovnání s Lámankou (obrázek 22). U metody ABTS lze pozorovat vyšší antioxidační kapacitu extraktů než u metody DPPH (obrázek 21, 22). Příčinou může být selektivita DPPH činidla, které nemusí reagovat se všemi látkami přítomnými v extraktech. Doba klíčení téměř neovlivňuje uvolnění fenolických látek z vazby na buněčnou stěnu.

Hodnoty v jednotlivých dnech se téměř neliší, proto stačí pohanku klíčit pouze jeden den. Pro výrobce je významné, že antioxidační aktivitu obou těchto rostlin lze ovlivnit podmínkami růstu a výběrem vhodné odrůdy.



Obrázek 21: Antioxidační kapacita vzorku Kroupa a vliv klíčení.



Obrázek 22: Antioxidační kapacita vzorku Lámanka a vliv klíčení.

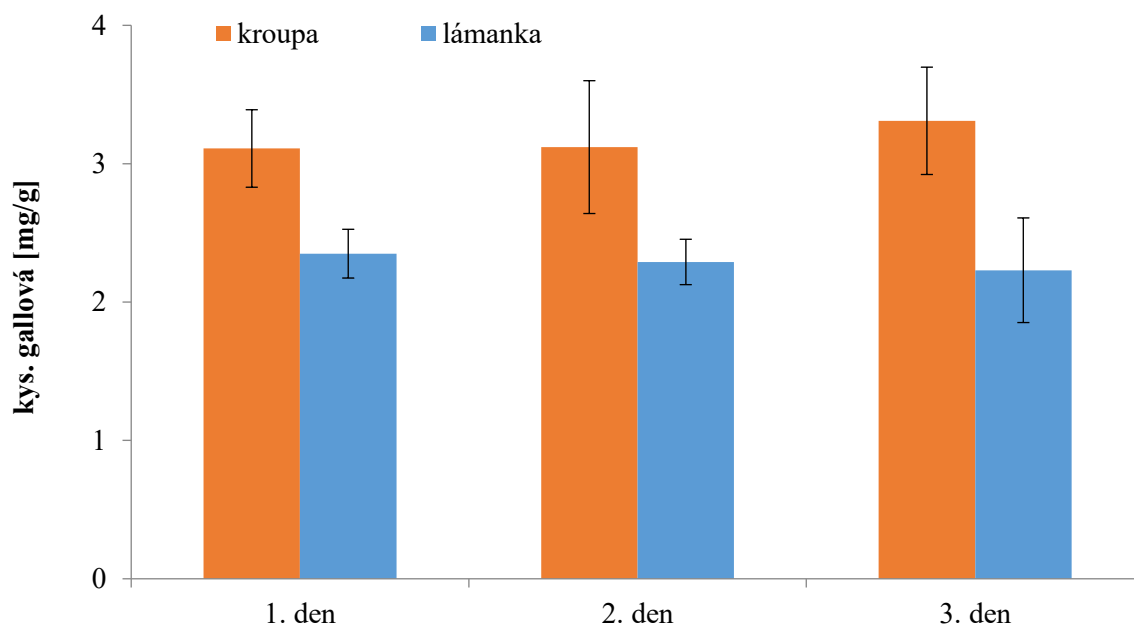
- FCM

Nejprve byl u všech extraktů optimalizován dávkovaný objem vzorku a reakční doba směsi, které se lišily v závislosti na analyzovaném vzorku. Pro stanovení celkového množství fenolických látek byl zvolen optimální objem 50 μl (3krát ředěného) extraktu pohanky. Reakční doba byla 30 minut. Nárůst absorbance byl vypočítán dle následujícího vztahu:

$$\Delta A = A - A_{blank}$$

kde A je absorbance vzorku v čase 30 min od počátku reakce a A_{blank} je absorbance slepého pokusu ve stejném čase.

Výsledky získané pomocí ABTS a DPPH byly potvrzeny i pomocí metody FCM. Na obrázku 23 lze pozorovat podobný trend jako u předchozích dvou metod. Vzorek Kroupa obsahoval vyšší množství fenolických látek než vzorek Lámanka. Doba klíčení neměla vliv na celkový obsah fenolických látek. Celkově byly provedeny dvě extrakce a tři nezávislé pokusy klíčení (18 měření).



Obrázek 23: Celkový obsah fenolických látek sledovaný u pohanky kroupy a pohanky Lámanky po dobu tří dní.

1.7.3 Amarant

Optimalizace HPLC a HPLC/MS

Nejprve byla optimalizována koncentrace kyseliny mravenčí v mobilní fázi, organická složka mobilní fáze a strmost gradientu. Pro stanovení fenolických látek byl využit hmotnostní spektrometr v MRM režimu a jednotlivé parametry jsou uvedeny v tabulce 12.

Tabulka 12: Optimalizované parametry pro MS/MS analýzu amarantu.

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
Glykosid 4-hydroxybenzoové k	1	1,98	299	137	-80	-20	-6
Glykosid 4-hydroxybenzoové k.	2	2,06	431	137	-100	-30	-5
Glykosid vanilové k.	3	2,16	329	167	-80	-20	-5
3,4-dihydroxybenzoová k.	4	3,05	153	109	-50	-20	-7
Glykosid vanilové k.	5	3,13	329	167	-115	-20	-5
Glykosid 4-hydroxybenzoové k.	6	3,27	299	137	-150	-20	-5
Glykosid ferulové k.	7	3,36	355	193	-75	-20	-6
Glykosid 4-hydroxybenzoové k.	8	3,37	299	137	-150	-20	-5
Glykosid 4-hydroxybenzoové k.	9	3,50	299	137	-150	-20	-5
Glykosid vanilové k.	10	3,58	329	167	-140	-20	-5
Glykosid vanilové k.	11	3,68	329	167	-140	-20	-5
Glykosid vanilové k.	12	3,97	299	167	-50	-20	-6
4-hydroxybenzoová k.	13	4,17	137	93	-50	-20	-3
Glykosid ferulové k.	14	4,35	355	193	-75	-20	-6
Kávová k.	15	4,55	179	135	-70	-20	-7
Vanilová k.	16	4,68	167	123	-50	-18	-5
Kaffeoylchinová k.	17	4,74	353	111	-50	-30	-7
Kaffeoylchinová k	18	4,92	353	111	-50	-30	-7
Rutin	19	5,48	609	300	-140	-48	-5
Kumaroylchinová k.	20	5,57	337	111	-50	-30	-7
<i>p</i> -kumarová k.	21	5,66	163	119	-45	-18	-9
Isokvercitrin	22	5,80	463	300	-160	-40	-6
Kumaroylchinová k.	23	5,83	337	111	-50	-30	-7
Feruoylchinová k.	24	5,91	367	173	-50	-20	-5
Kaempferol-rutinosid	25	5,98	593	285	-120	-40	-5
Feruoylchinová k.	26	6,06	367	173	-50	-20	-5
Ferulová k. cis	27	6,12	193	134	-45	-22	-11
Ferulová k. trans	28	6,46	193	134	-45	-22	-11
Myricetin	29	7	317	151	-125	-30	-9
Salicylová k.	30	7,94	137	93	-50	-20	-3
Kvercetin	31	8,19	301	151	-90	-30	-7
Kaempferol	32	8,55	285	185	-130	-36	-7

v případě stejného názvu látky se vždy jedná o deriváty

Pro experiment byla vybrána různá rozpouštědla jako je 70% (v/v) aceton a 80% (v/v) methanol. Pro okyselení rozpouštědla byla použita HCOOH. Nejvyšší obsah sledovaných fenolických látek byl přítomen v extraktech s 80% methanolem a nejnižší v extraktech

se 70% acetonem. Následně byl zkoumán vliv dvojité extrakce na množství přítomných fenolických látek, kde se po prvním extrakčním kroku přidala směs diethyletheru a ethylacetátu v poměru 1:1 (v/v). Z důvodu nevytvoření fázového rozhraní v případě použití 80% methanolu v prvním kroku byl testován pouze 70% aceton. Dále byl testován vliv ultrazvuku na účinnost extrakce. Souhrn všech použitých extrakcí je znázorněn v experimentální části v tabulce 4.

Pro optimalizaci separace byl vybrán modelový vzorek (E3, 80% methanol okyselený HCOOH), který měl vyšší obsah fenolických látek. Bylo optimalizováno složení mobilní fáze (methanol, acetonitril), průtok mobilní fáze, teplota kolony, počáteční koncentrace organické složky při gradientové eluci a strmost gradientu. Optimální podmínky separace jsou uvedeny v experimentální části v kapitole 1.6.3.6.

Kvantifikace fenolických látek

Kvantitativní analýza byla provedena prostřednictvím metody vnějšího standardu – pomocí kalibrační křivky. Výsledná koncentrace všech monitorovaných fenolických látek je uvedena v příloze (tabulka P3). Regresní parametry lineární závislosti ploch pod píkem na koncentraci látek (úsek, směrnice a koeficient determinace) jsou uvedeny spolu s LOD a LOQ v tabulce 13. Na obrázku 24 je znázorněna optimalizovaná separace standardů fenolických látek v amarantovém extraktu. Látky, pro které nebyl k dispozici standard, byly stanoveny s využitím strukturně podobných dostupných standardů (tabulka 14). Sloučeniny s autentickým standardem nejsou v tabulce 14 zobrazeny.

Tabulka 13: Regresní parametry, meze detekce a meze stanovitelnosti pro jednotlivé fenolické látky obsažené v amarantu.

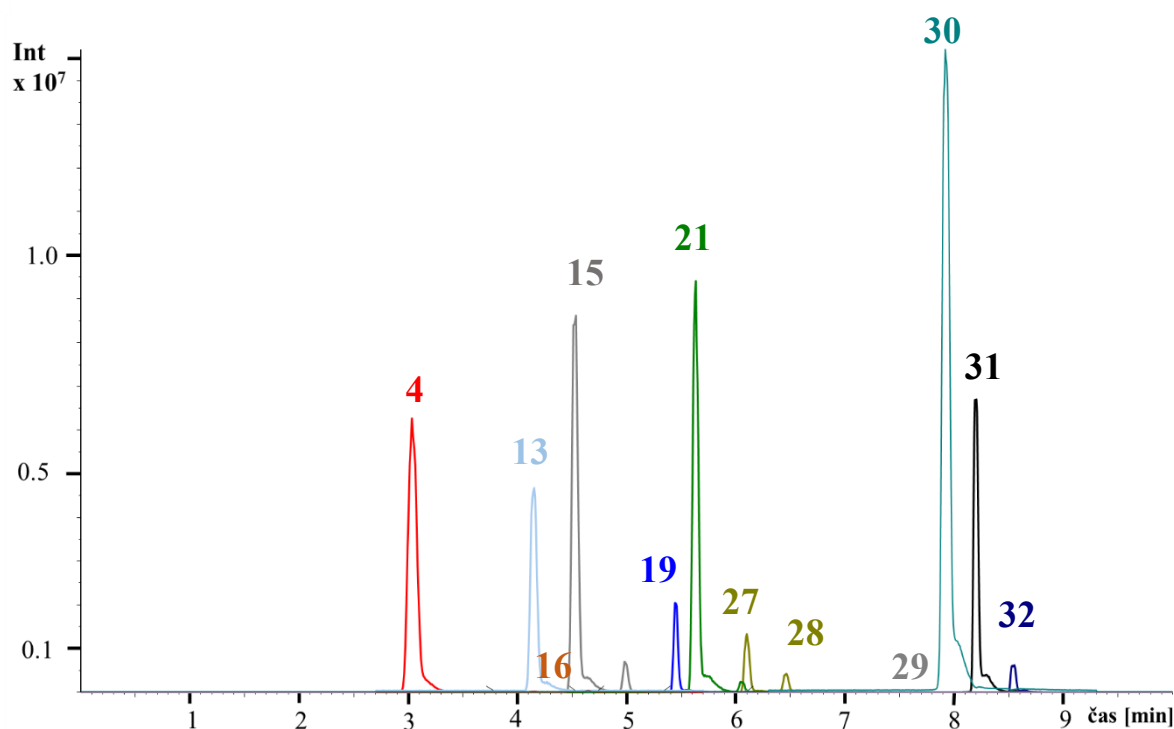
Látka	LOD [ng/ml]	LOQ [ng/ml]	Směrnice	Úsek	R ²
Kaempferol	2,17	7,23	670 ± 88	6300 ± 302	0,9964
Vanilová kys.	7,95	26,5	50 ± 17	-13000 ± 1347	0,9948
Ferulová kys.	2,87	9,56	1400 ± 121	-51000 ± 2066	0,9932
Kvercetin	8,63	28,8	9700 ± 745	7000 ± 1359	0,9951
Rutin	5,64	18,8	1550 ± 46	4200 ± 601	0,9989
3,4-DHB kys.	17,1	57,1	9900 ± 844	143000 ± 4038	0,9986
p-kumarová kys.	16,3	54,4	13000 ± 2282	68000 ± 5101	0,9909
Kávová kys.	10,2	34,1	10700 ± 438	194000 ± 3040	0,9961
4-HBA kys.	47,6	158	6000 ± 1107	-357000 ± 4361	0,9923
Salicylová kys.	74,7	248	35000 ± 1491	73000 ± 2045	0,9945
Myricetin	1,73	5,54	40 ± 12	-11300 ± 537	0,9953

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

Z vybraných sloučenin byly v monitorovaných extraktech amarantu zastoupeny zejména glykosidy kyseliny ferulové, vanilové a 4-hydroxybenzoové. Naopak salicylová kyselina, vanilová kyselina, kvercetin a kaempferol se nevyskytovaly v koncentracích nad LOQ.

Tabulka 14: Kvantifikace fenolických látek na dostupné standardy.

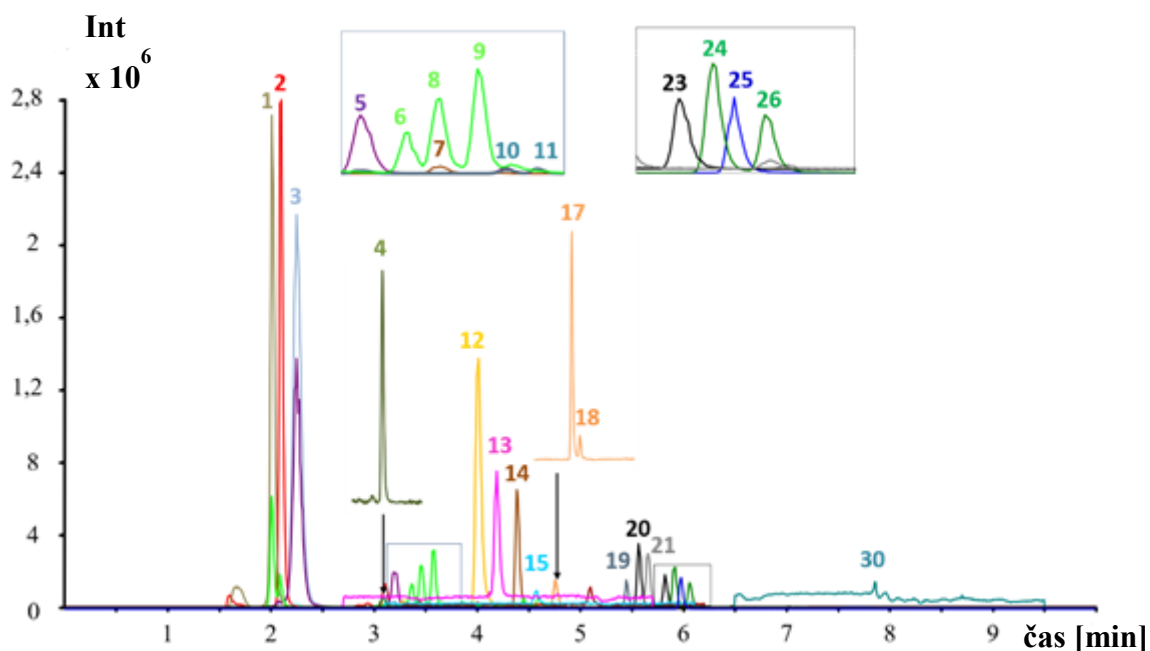
Standard	Látka
4-HBA	Glykosid 4-hydroxybenzoové kyseliny
Vanilová kyselina	Glykosid vanilové kyseliny
Ferulová kyselina	Glykosid ferulové kyseliny a feruoylchinová kyselina
Káвовá kyselina	Kaffeoylchinová kyselina
<i>p</i> -kumarová kyselina	Kumaroylchinová kyselina
Kvercetin	Isokvercitrin
Kaempferol	Kaempferol-rutinosid



Obrázek 24: Optimalizovaná separace standardů amarantu.

Kolona: Ascentis Express C18 (150 mm × 3,0 mm × 2,7 μm), mobilní fáze: ACN/H₂O + HCOOH (pH 2,43), gradient: 0 minut – 10 % ACN, 6 min – 37 % ACN, 7 min – 100 % ACN, průtok: 0,4 ml/min; dávkování: 2 μl, teplota kolony: 40 °C, detekce: ESI-MS; MRM přechody viz tabulka 14. 4–3,4-DHB, 13–4-HBA, 15–káвовá kyselina, 16–vanilová kyselina, 19–rutin, 21–*p*-kumarová kyselina, 27,28–ferulová kyselina, 29–myricetin, 30–salicylová kyselina, 31–kvercetin, 32–kaempferol.

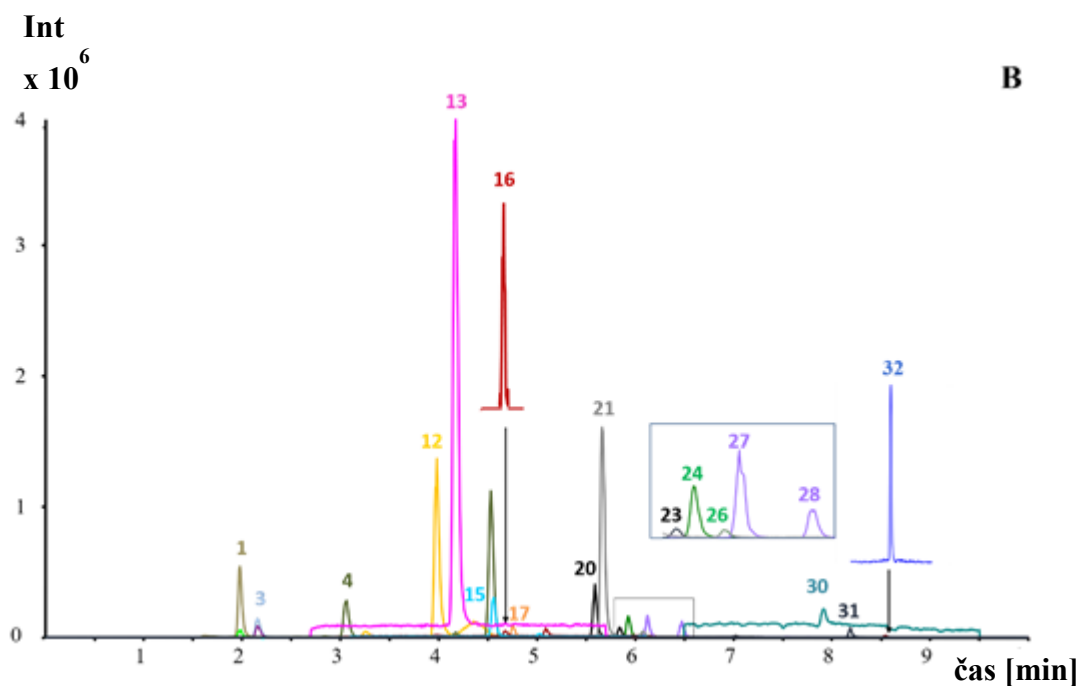
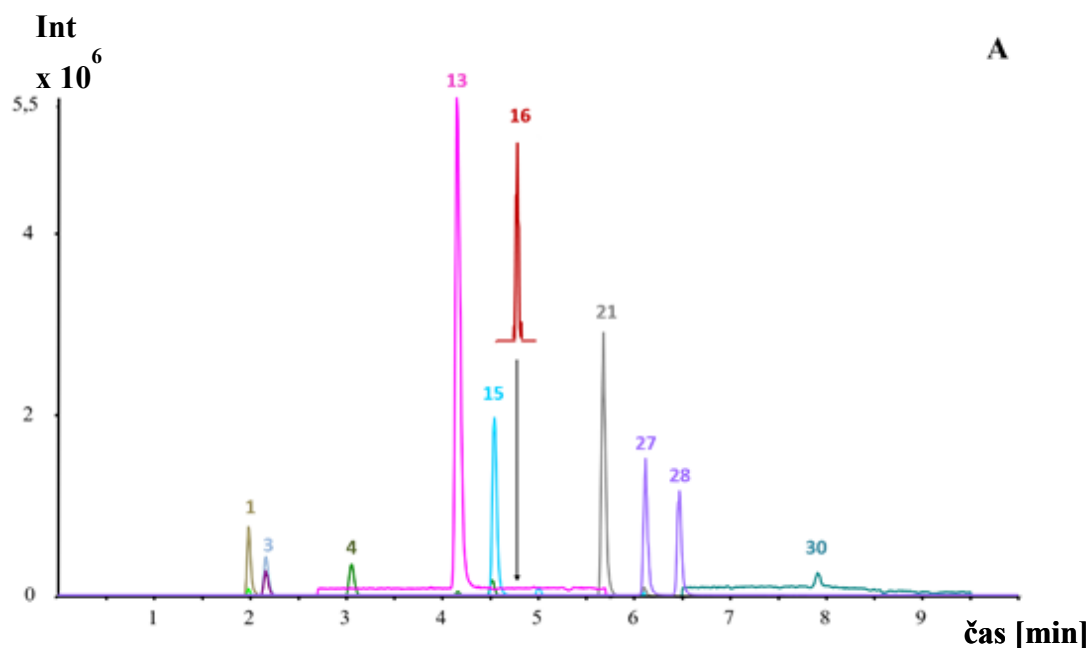
Pro porovnání extraktů amarantu bylo analyzováno 15 různých extraktů s dvojnásobným opakováním (30 extraktů), které byly třikrát změřeny pomocí optimalizované HPLC-MS/MS metody. Na obrázku 25 je ukázka chromatografického záznamu extraktu E3 (80% methanol + kyselina mravenčí). Intenzita a koncentrace monitorovaných látek se značně liší. V tomto extraktu se vyskytují především glykosidy fenolických kyselin, zejména kyseliny 4-hydroxybenzoové (1, 2, 6, 8 a 9), vanilové (3, 5, 10, 11 a 12) a ferulové (7 a 14). Z volných fenolických látek lze zaznamenat výskyt kyseliny 4-hydroxybenzoové (13) a *p*-kumarové (21). Eluce kyseliny kumarové byla zaznamenána v retenčních časech 5,66 a 6,08 minut, kdy prostřednictvím srovnání retenčního času standardu a látky byl přiřazen kyselině *p*-kumarové první pík (5,66) a v čase 6,08 minut se jednalo pravděpodobně o její izomer. Dalšími zástupci byly kyselina 3,4-dihydroxybenzoová (4) a kávová (15). Kyseliny vanilová (16) a salicylová (30) nebyly nalezeny v žádném vzorku. Dále byly zaznamenány deriváty kyseliny chinové jako je kyselina kafeoylchinová (17 a 18), kumaroylchinová (20 a 23) a feruoylchinová (24 a 26). Tyto kyseliny lze najít v přírodních matricích v různých izomerních formách. Vzorky obsahovaly i některé flavonoidy jako je rutin (19) a kaempferol-rutinosid (25). Výslednou koncentraci sledovaných fenolických látek v extraktech amarantu (E1–E10) lze najít v příloze (tabulka P3), z níž vyplývá, že profil fenolických látek je obdobný a rozdíl je pouze v intenzitě.



Obrázek 25: Chromatografická separace látek obsažených v extraktu E3 (80% methanol + kyselina mravenčí).

Kolona: Ascentis Express C18 (150 mm × 3,0 mm × 2,7 μm); mobilní fáze: ACN/H₂O + HCOOH (pH 2,43), gradient: 0 minut – 10 % ACN, 6 min – 37 % ACN, 7 min – 100 % ACN, průtok: 0,4 ml/min; dávkování: 2 μl, teplota kolony: 40 °C; detekce: ESI-MS; MRM přechody viz tabulka 14. 1,2-glykosidy 4-HBA, 3-glykosid kyseliny vanilové, 4-3,4-DHB, 5-glykosid kyseliny vanilové, 6,8,9-glykosidy 4-HBA, 7-glykosid kyseliny ferulové, 10, 11-glykosidy kyseliny vanilové, 12-glykosid kyseliny vanilové, 13-4-HBA, 14-glykosid kyseliny ferulové, 15-kávová kyselina, 17,18-kafeoylchinová kyselina, 19-rutin, 20,23-kumaroylchinová kyselina, 21-*p*-kumarová kyselina, 24,26-feruoylchinová kyselina, 25-kaempferol-rutinosid; 30-salicyllová kyselina.

Pro vyvázání fenolických látek z buněčné stěny pseudoobilovin se používá kyselá a alkalická hydrolyza. Porovnáním záznamů hydrolyzovaných extraktů (obrázek 26) bylo zjištěno, že při alkalické hydrolyze je dosaženo vyšších intenzit uvolněných fenolických látek. Naopak kyselá hydrolyza vykazovala větší pestrost fenolického profilu. Po alkalické hydrolyze byly v extraktech nalezeny především kyselina kávová (15), *p*-kumarová (21) a ferulová (27 a 28). U kyseliny ferulové se vyskytovaly dva píky, což bylo způsobeno její konfigurací *-cis* a *-trans*. Jelikož se ve vzorku nachází velké množství kyseliny 4-hydroxybenzoové, tak hydrolytickým štěpením vznikl velký počet jejích glykosidů, a proto má na záznamu nejvyšší intenzitu.



Obrázek 26: Chromatografická separace vázaných fenolických látek po alkalické (A) a kyselé (B) hydrolyze.

Kolona: Ascentis Express C18 (150 mm × 3,0 mm × 2,7 μm); mobilní fáze: ACN/H₂O + HCOOH (pH 2,43), gradient: 0 minut – 10 % ACN, 6 min – 37 % ACN, 7 min – 100 % ACN, průtok: 0,4 ml/min, dávkování: 2 μl, teplota kolony: 40 °C, detekce: ESI⁻/MS, MRM přechody viz tabulka 10. 1–glykosid 4-HBA, 3–glykosid vanilové kyseliny, 4–3,4-DHB, 12–glykosid vanilové kyseliny, 13–4-HBA, 15–káвовá kyselina, 16–vanilová kyselina, 17–kafeoylchinová kyselina, 20, 23–kumaroylchinová kyselina, 21–*p*-kumarová kyselina, 24,26 – feruoylchinová kyselina, 27,28–ferulová kyselina, 30–salicylová kyselina, 31–kvercetin, 32–kaempferol.

Spektrofotometrické metody

Antioxidační aktivita byla měřena u vzorků amarantu pomocí metod ABTS a FCM. Z důvodu minimální reakce extraktu s DPPH radikálem nebyla tato metoda využita.

- ABTS

Při stanovení antioxidační aktivity byl nejprve optimalizován objem a ředění extraktů. V důsledku nízké antioxidační kapacity extraktů z amarantu nebylo nutné ředění a pro reakci bylo vždy dávkováno 100 μ l neředěného extraktu. Pro naředění zásobního roztoku ABTS byl použit octanový pufr (pH 4,3). Úbytek absorbance byl ve všech případech vypočítán podle následujícího vztahu:

$$\text{úbytek } A = \frac{A_{\text{blank}} - A}{A_{\text{blank}}} \cdot 100 \text{ [\%]}$$

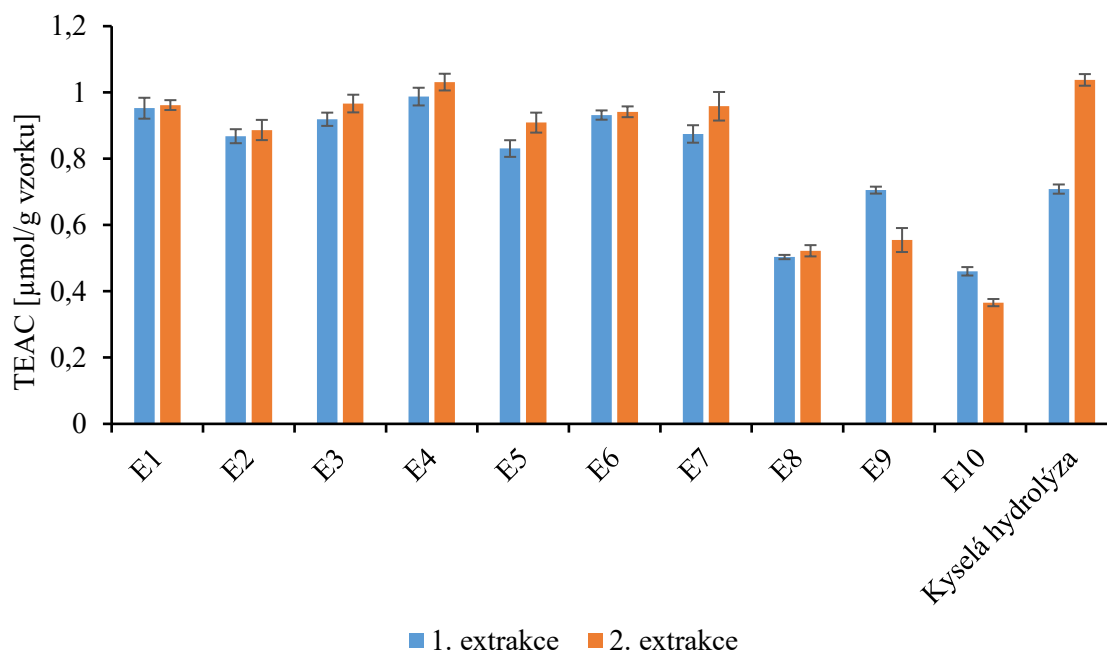
kde A je absorbance vzorku v čase a A_{blank} je absorbance slepého pokusu. Reakční doba ABTS byla 60 minut.

Pro stanovení antioxidační aktivity bylo měřeno 22 extraktů po pěti opakováních. Jelikož se při alkalické hydrolyze přidává kyselina askorbová, která je antioxidantem, nebyl tento extrakt z důvodu ovlivnění výsledků měřen. Úbytek absorbance u veškerých monitorovaných extraktů byl pomocí rovnice regrese z kalibrační křivky přepočítán na ekvivalentní množství Troloxu.

Výsledná hodnota celkové antioxidační aktivity byla vztažena na (1 g amarantových zrn dle následujícího vztahu:

$$\text{TEAC } (\mu\text{mol/g}) = \frac{\text{aktivita vzorku } (\mu\text{mol Troloxu})}{m \text{ (g)}} \cdot f_R$$

kde m je navážka vzorku amarantových zrn a f_R je faktor zahrnující dávkované množství extraktu vzorku a ředění. Obrázek 27 znázorňuje antioxidační aktivitu pro rozdílné typy extrakce a přípravy.



Obrázek 27: Antioxidační aktivita fenolických látek různých extraktů získaných ze vzorků amarantových zrn.

Na obrázku 27 lze vidět, že největší antioxidační aktivitu vykazovaly extrakty okyselené HCOOH (E1, E3, E4, E6 a E7). Extrakty, které nebyly okyselené (E2 a E5), měly nižší hodnoty TEAC. Hodnoty TEAC u extraktů E1, E3, E4, E6 a E7 připravených jednokrokovou extrakcí jsou v rozmezí 0,87 – 1,03 $\mu\text{mol/g}$. Nejnižší hodnoty byly naměřeny u vícekových extrakcí, kde po extrakci methanolem následovala extrakce směsí diethyletheru a ethylacetátu (E8, E9 a E10), kde se předpokládá, že fenolické látky nepřešly do organické části extraktu. Dále lze porovnat vliv ultrazvuku na antioxidační aktivitu, která v případě použití methanolu (E4) vzrostla. U vícekových reakcí byla hodnota TEAC vyšší v případě třepání (E8 a E9) než při využití ultrazvuku (E10). Extrakt po kyselé hydrolyze měl srovnatelnou hodnotu TEAC jako extrakty bez okyselení E3 a E5. Přesné hodnoty TEAC jsou uvedeny v příloze (tabulka P4).

- **FCM**

Nejdříve byl u všech extraktů optimalizován dávkovaný objem vzorku a reakční doba směsi, které se lišily v závislosti na analyzovaném vzorku. Pro stanovení celkového množství fenolických látek byl zvolen jako optimální objem 100 μ l. Reakční doba byla 30 minut. Nárůst absorbance byl vypočítán dle následujícího vztahu:

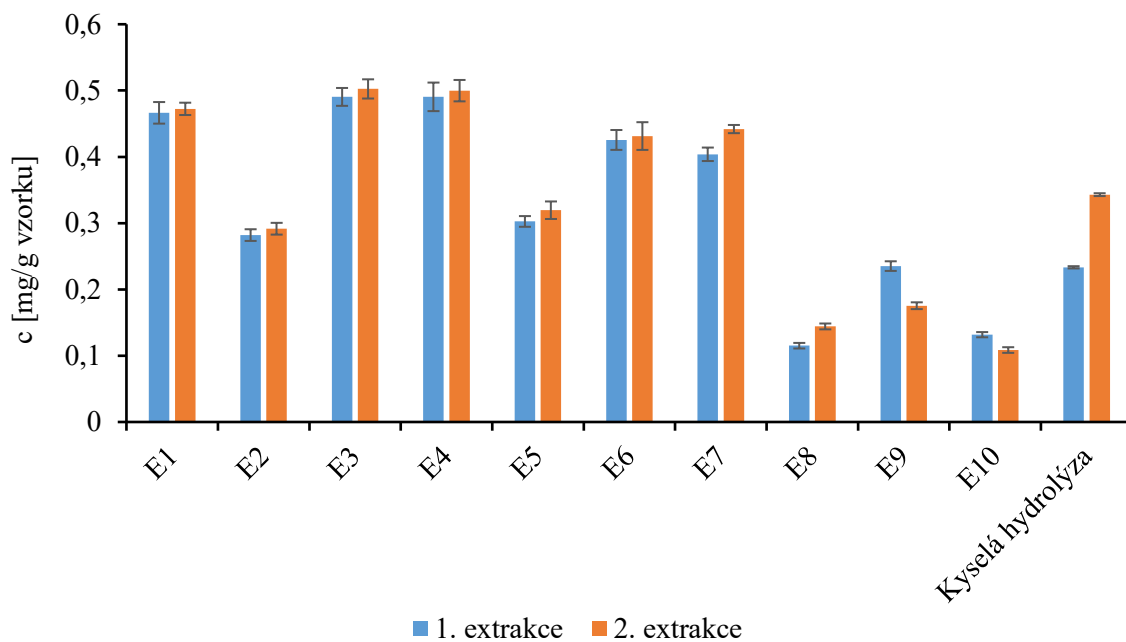
$$\Delta A = A - A_{blank}$$

kde A je absorbance vzorku v čase 30 min od počátku reakce a A_{blank} je absorbance slepého pokusu ve stejném čase.

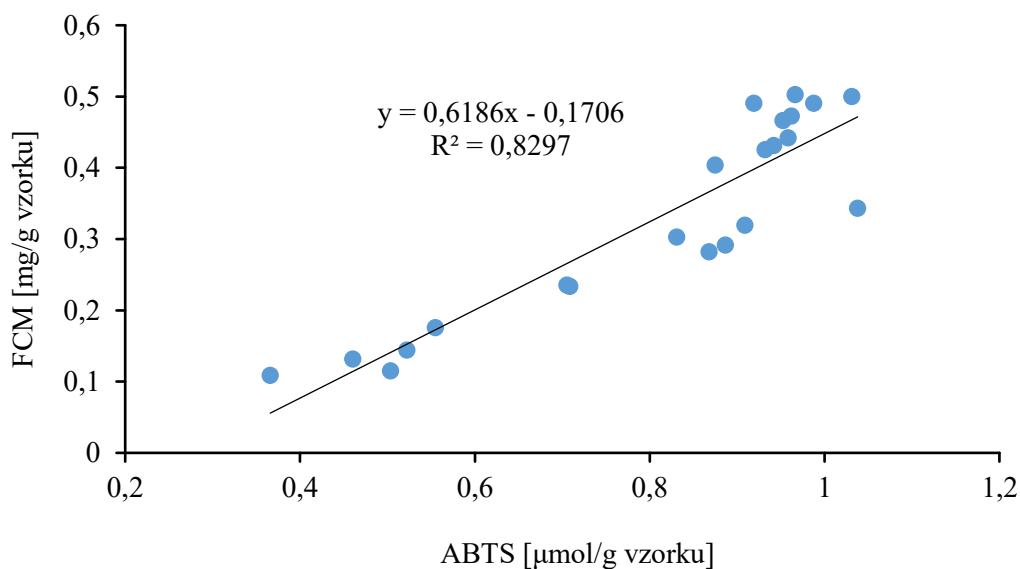
Ke stanovení celkového množství fenolických látek bylo vybráno 10 typů extraktů amarantových zrn a jeden kyselé hydrolyzovaný extrakt. Každý extrakt byl připraven dvakrát, takže bylo analyzováno celkově 22 extraktů. Alkalicky hydrolyzované vzorky nemohly být změřeny z důvodu přítomnosti kyseliny askorbové.

Na obrázku 28 je ukázka sloupcového grafu, kde je možné pozorovat vliv různých typů extrakcí na množství fenolických látek. Obdobně jako u ABTS okyselení zapříčinilo zvýšení celkového množství fenolických látek během extrakce a zároveň větší reaktivitu s Folin-Ciocalteuovým činidlem. Nízký obsah fenolických látek u extraktu E7 byl nejspíš způsoben nedokonalou extrakcí nebo případnou chybou během přípravy. Stejně jako u ABTS byl nejmenší obsah fenolických látek pozorován u vícekrokových extraktů (E8–E10), kde po extrakci methanolem následovala extrakce směsí diethyletheru a ethylacetátu. Hodnoty E8, E9 a E10 byly v rozmezí 0,11–0,24 mg/g. U neokyselených methanolových (E2) a acetonových extraktů (E5) nebyl pozorován žádný rozdíl. Hodnoty GAE (ekvivalent kyseliny gallové) okyselených extraktů byly však vyšší. V experimentu bylo pozorováno, že okyselený methanolový extrakt (E3) vykazoval lepší výsledky než okyselený acetonový extrakt (E5). Obdobně jako u metody ABTS zvýšila HCOOH účinnost methanolové extrakce (E1, E3 a E4) a obdobně i působení ultrazvuku zvýšilo hodnoty v případě methanolu (E4), ale ne u extrakcí acetonem (E7, E10). Ovšem u vícekrokové extrakce se ultrazvukem množství fenolických látek snížilo. Veškeré výsledky celkového množství fenolických látek lze najít v příloze (tabulka P3). Na obrázku 29 je znázorněn graf lineární regrese závislosti koncentrace ekvivalentu kyseliny gallové (GAE, metoda FCM) na koncentraci TEAC (metoda ABTS), z kterého vyplývá silná korelace mezi naměřenými hodnotami pomocí ABTS a FCM.

Z hlediska metody FCM byl hlavní rozdíl pozorován u neokyselených extraktů E2 a E5, kde byla intenzita výrazně nižší než u okyselených.



Obrázek 28: Celkové množství fenolických látek různých extraktů získaných ze vzorků amarantových zrn.



Obrázek 29: Závislost mezi celkovým množstvím fenolických látek (FCM metoda) a celkovou antioxidační aktivitou (ABTS metoda).

1.8 ZÁVĚR

Kvalitativní a kvantitativní profil fenolických látek v potravinách a potravinových surovinách je obvykle stanovován pomocí HPLC-MS po jejich předchozí izolaci extrakčním systémem kapalina-kapalina nebo kapalina-pevná látka. Analýza medovin byla provedena na oktadecylsilikagelové koloně, kde bylo za 6 minut rozseparováno 23 látek. Z důvodu potlačení disociace fenolických kyselin tvořila vodnou část mobilní fáze deionizovaná voda okyselená kyselinou mravenčí a organickou částí mobilní fáze byl acetonitril. Identifikace fenolických látek byla provedena pomocí HPLC-MS analýzy při snímání záporných iontů. Pro přesnější strukturní informace bylo následně využito tandemové hmotnostní spektrometrie, kde byl pro každou látku optimalizován a vybrán jeden MRM přechod. Pro kvantitativní analýzu bylo využito metody vnějšího standardu. Z validačních parametrů byla stanovena přesnost, správnost a opakovatelnost metody, koeficient determinace, linearita, LOD a LOQ. Výsledky stanovení fenolických látek v medovinách byly podrobeny analýze hlavních komponent, kde bylo vybráno 10 proměnných (kvercetin, kyselina 3,4-dihydroxybenzoová, vanilin, salicylová, kávová, gentisová, *p*-kumarová, ferulová, chlorogenová a *m*-kumarová). Cílem této analýzy bylo zkoumání vlivu původu vzorku a jeho zpracování na obsah fenolických látek. Z výsledků vyplývá, že medoviny od včelařů mají všeobecně vyšší celkovou koncentraci fenolických látek než ty zakoupené v obchodních sítích. Extrakty medovin byly podrobeny analýze hlavních komponent, z které lze konstatovat, že hlavní komponenta PC1 odpovídá celkovému množství fenolických látek ve vzorcích medovin a všechny vzorky jsou tímto faktorem ovlivněny. Podle grafu komponentního skóre byly extrakty medovin rozděleny dle koncentrace fenolických látek do menších shluků. Nejvyšší koncentraci fenolických látek z vybraných vzorků medovin měly dvě medová vína (č. 7 a 9), která jsou specifická přídavkem ovocné šťávy během výrobního procesu. Důvodem je, že ovoce obsahuje další fenolické látky (například kvercetin), které se běžně v medovině nevyskytují. Naopak vzorky medovin č. 15, 18 a 19 obsahovaly velmi nízkou celkovou koncentraci fenolických látek. Všechny tři vzorky byly během výrobního procesu vařeny, takže příčinou mohla být degradace fenolických látek. U vzorků připravených z lesních medů byla objevena vyšší koncentrace kyseliny salicylové, která je součástí medovice. Vzorek č. 15 obsahoval vysokou koncentraci vanilinu, používaného jako ochucovadlo a nízkou celkovou koncentraci fenolických látek. Příčinou mohlo být použití nekvalitního medu nebo menšího množství během výrobního procesu. Lze tedy konstatovat, že během výroby této medoviny nebyla dodržena správná výrobní praxe a jedná se o falšovaný produkt.

Pro analýzu pseudoobilovin byla použita oktadecylsilikagelová kolona, kde bylo v případě pohanky rozseparováno 37 látek za 14 minut a u amarantu 32 látek za 9 minut. Stejně jako při analýze medovin byla z důvodu potlačení disociace fenolických kyselin vodná část mobilní fáze okyselená kyselinou mravenčí. Organickou částí mobilní fáze byl u pohanky methanol a v případě amarantu acetonitril. Pro identifikaci fenolických látek bylo využito HPLC-MS-MS analýzy v MRM režimu. Pro kvantitativní účely byla použita metoda vnějšího standardu. Cílem analýzy fenolických látek v extraktech pohanky bylo porovnat dva termicky neupravené vzorky (Kroupa a Lámanka), které se lišily technologickým postupem a vliv klíčení na obsah fenolických látek. Vyšší obsah fenolických látek byl nalezen v extraktech Lámanky, což mohlo být způsobeno právě technologickým postupem, kdy jsou v tomto případě zrna rozdracena na menší kousky než u Kroupy. Při výzkumu vlivu klíčení bylo zjištěno, že v případě prvního dne došlo k výraznému nárůstu obsahu fenolických látek a v průběhu dalších dní klíčení bylo další zvýšení obsahu fenolických látek zanedbatelné. Lze tedy konstatovat, že doba klíčení nemá téměř žádný vliv a je dostačující klíčit pohanku pouze jeden den. V pseudoobilovinách se fenolické látky vyskytují ve volné i vázané formě, proto byla v případě amarantu použita hydrolýza, která uvolnila vázané fenolické kyseliny z vazeb. U některých kyselin došlo během hydrolýzy k rozkladu a uvolnění z vázaných forem. Dále se testoval vliv extrakčních činidel na obsah fenolických látek, kde byl nejlepší volbou 80 % methanol. U obou pseudoobilovin bylo prokázáno, že okyselení zvyšuje účinnost extrakce. V případě amarantu byla porovnána kyselá i alkalická hydrolýza. Kyselá hydrolýza poskytla větší pestrost fenolického profilu, zatímco alkalická vyšší intenzity monitorovaných fenolických látek. U obou pseudoobilovin byla stanovena antioxidační aktivita pomocí metod ABTS, DPPH a FCM. V případě amarantu bylo dokázáno, že nejvyšší hodnoty antioxidační aktivity i celkového množství fenolických látek vykazují extrakty s přídavkem kyseliny mravenčí, naopak nejnižší hodnoty mají vícekrokové extrakty, kde po extrakci methanolem následuje extrakce diethyletherem a ethylacetátem. Z hlediska porovnání těchto dvou pseudoobilovin lze konstatovat, že amarantová zrna se vyznačují nižším obsahem fenolických látek bez ohledu na použitou extrakci.

1.9 LITERATURA

- (1) IBÁÑEZ E., CIFUENTES A. New analytical techniques in food science. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2001. 41, 413-450.
- (2) SEÑORÁNS F. J., IBÁÑEZ E., CIFUENTES A. New Trends in Food Processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2003. 43, 507-526.
- (3) GOLDBERG I. *Functional Foods, Designer Foods, Pharmafoods*. London: Chapman and Hall, 1996. ISBN: 978-1-4615-2073-3.
- (4) 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.
- (5) LEOPOLDINI, M., MARINO, T., RUSSO, N., TOSCANO, M. Antioxidant Properties of Phenolic Compounds: H-Atom versus Electron Transfer Mechanism. *Journal of Physical Chemistry A*. 2004. 108, 4916-4922.
- (6) WILSON, D. W., NASH, P., BUTTAR, H. S., GRIFFITHS, K., SINGH, R., DE MEESTER, F., HORIUCHI, R., TAKAHASHI, T. The Role of Food Antioxidants, Benefits of Functional Foods, and Influence of Feeding Habits on the Health of the Older Person: An Overview. *Antioxidants*. 2017. 6, 81.
- (7) BRAVO L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*. 1998. 56, 317-333.
- (8) CHEYNIER, Véronique. Phenolic compounds: from plants to foods. *Phytochemistry Reviews*. 2012. 11, 153-177.
- (9) COSTA, D. C., COSTA, H. S., ALBUQUERQUE, T. G., RAMOS, F., CASTILHO, M. C. SANCHES-SILVA, A. Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications. *Trends in Food Science & Technology*. 2015. 45, 336-354.
- (10) ALU'DATT, M. A review of phenolic compounds in oil-bearing plants: Distribution, identification and occurrence of phenolic compounds. *Food chemistry*. 2017. 18, 218.
- (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) TADAPANENI, R. K. Effect of High Pressure Processing & Dairy on the Antioxidant Activity of Strawberry Based Beverages. Dissertation Thesis. College of the Illinois Institute of Technology. 2010. 14.
- (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) SCHUSTER, B., HEMANN, K. Hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acid derivatives in soft fruits. *Phytochemistry*. 1985. 24, 2761.
- (15) 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.
- (16) 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.
- (17) 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.
- (18) PIETTA, P. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Product*. 2000. 63, 1035-1042.
- (19) 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.
- (20) PAULOVÁ, H., BOCHOŘÁKOVÁ H., TÁBORSKÁ, E., Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro, *Chemické. Listy*. 2004. 98, 174-179.
- (21) STRATIL P., KLEJDUS, B., KUBÁŇ, V. Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals, *Talanta*. 2007. 71, 1741-1751.
- (22) VERMERRIS, W., NICHOLSON, R. Phenolic compound Biochemistry. 2009. West Lafayette, IN U.S.A.: Springer Science & Business Media. ISBN: 978-1-4020-5164-7.
- (23) CICCO, N., LANORTE, M. T., PARAGGIO, M., VIGGIANO, M., LATTANZIO, V. A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal*. 2009. 91, 107-110.
- (24) MILLER, N. J., RICE-EVANS, C., DAVIES, M. J., GOPINATHAN, V., MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*. 1993. 84, 407-412.

- (25) RICE-EVANS, C., MILLER, N. J. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods in Enzymology*. 1994. 234, 279-293.
- (26) MILLER, N. J., RICE-EVANS. Spectrophotometric determination of antioxidant activity. *Redox report*. 1996. 2, 161-171.
- (27) SERPEN A., CAPUANO E., FOGLIANO V. A new procedure to measure the antioxidant activity of insoluble food components, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007. 55, 7676–7681.
- (28) RE, R., PELLEGRINI N., PROTEGGENTE A., PANNALA A., YANG M., RICE-EVANS C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization Assay, *Free Radical Biology and Medicine* 1999. 26, 1231–1237.
- (29) BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M., BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food science technology*. 1995, 28, 25-30.
- (30) ROP, O., MLČEK, J., JURIKOVA, T., VALSIKOVA, M., SOCHOR, J., KRAMAROVA, D., Phenolic content, antioxidant capacity, radical oxygen species scavenging and lipid peroxidation inhibiting activities of extracts of five black chokeberry, *Journal of Medicinal Plants Research*. 2010. 4, 2431-2437.
- (31) DECKER, E. A., ELIAS, R. J., MCCLEMENTS, D. J. Oxidation in Foods and Beverages and Antioxidant Applications: Management in Different Industry Sectors. 2010. Elsevier. ISBN: 978-0-8570-9033-1.
- (32) ALAM, M. N., BRISTI, N. J., RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2013. 21, 143-152.
- (33) DAI, J., MUMPER, R. J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*. 2010. 15, 7313-7352.
- (34) ŠULC M., LACHMAN, J., HAMOUZ, K., ORSÁK, M., DVOŘÁK, P., HORÁČKOVÁ, V. Výběr a zhodnocení vhodných metod pro stanovení antioxidační aktivity červených a fialových odrůd brambor, *Chemické Listy*. 2007. 101, 584–591.
- (35) PYRZYNSKA, K., BIESAGA, M. Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. *Trends in Analytical Chemistry*. 2009. 28, 7.
- (36) 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.

- (37) NACZK, M., SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006. 41, 1523-1542.
- (38) BALASUNDRAM, M., SUNDRAM, K., SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Analytical, Nutritional and Clinical Methods*. 2006. 99, 191-203.
- (39) LUTHRIA, D. L., PASTOR-CORRALES, M. A. Phenolic acids content of fifteen dry edible bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2006. 19, 205-211.
- (40) NACZK, N., SHADIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*. 2004. 1054, 95-111.
- (41) MERKEN, H. M., BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000. 48, 577-599.
- (42) NOVÁKOVÁ, L., DOUŠA, M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Praha: Lucie Nováková, Michal Douša, 2013. ISBN: 978-80-260-4243-3.
- (43) LIU, Q., CAI, W., SHAO, X. Determination of seven polyphenols in water by high performance liquid chromatography combined with preconcentration. *Talanta*. 2008. 77, 679-683.
- (44) CASTAÑEDA-OVANDO, A., PACHECO-HERNÁNDEZ, M. L., PÁEZ-HERNÁNDEZ, M. E., RODRÍGUEZ, J. A., GALÁN-VIDAL, C. A. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*. 2009. 113, 859.
- (45) LALAGUNA, F. Purification of fresh cassava root polyphenols by solid-phase extraction with Amberlite XAD-8 resin. *Journal of Chromatography A*. 1993. 657, 445-449.
- (46) 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.
- (47) 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.
- (48) BLEVE, M., CIURLIA, L., ERROI, E., LIONETTO, G., LONGO, L., RESCIO, L., SCHETTINO, E., VASAPOLLO, G. An innovative method for the purification of anthocyanins from grape skin extracts by using liquid and sub-critical carbon dioxide. *Separation and Purification Technology*. 2008. 64, 192-197.

- (49) GARCIA-SALLAS, P., MORALES-SOTO, A., SEGURA-CARRETERO, A., FERNÁNDEZ-GURIÉREZ, A. Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules*. 2010. 15, 8813-8826.
- (50) CHANDRASEKARA, A., SHADIDI, F. Determination of antioxidant activity in free and hydrolyzed fractions of millet grains and characterization of their phenolic profiles by HPLC-DAD-ESI-MSⁿ. *Journal of Functional Food*. 2011. 3, 144-158.
- (51) MATILLA, P., ASTOLA, J., KUMPULAINEN, J. Determination of flavonoids in plant material by HPLC with diode-array and Electro-array detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000. 48, 5834-5841.
- (52) DVOŘÁKOVÁ, M., GUIDO, L. M., DOSTÁLEK, P., SKULILOVÁ, Z., MOREIRA, M. M., BARROS, A. A. Antioxidant properties of free soluble ester and insoluble-bound phenolic compounds in different barely varieties and corresponding malts. *Journal of the Institute of Brewing*. 2008. 114, 27-33.
- (53) ARRANZ, S., CALIXTO, F. S. Analysis of polyphenols in cereals may be improved performing acidic hydrolysis: A study in wheat flour and wheat bran and cereals of the diet. *Journal of Cereal Science*. 2010. 51, 313-318.
- (54) SIROHI, R., PANDEY, J. P., SINGH, A., SINDHU, R., LOHANI, U. C., GOEL, R., KUMARD, A. Acid hydrolysis of damaged wheat grains: Modeling the formation of reducing sugars by a neural network approach. *Industrial Crops and Products*. 2020. 149, 112351.
- (55) AYOOLA, A., ADEEYO, O., EFEOVBOKHAN, V., OLASIMBO, A. Optimum hydrolysis conditions of cassava starch for glucose production. *International Journal of Advanced Research in IT and Engineering*. 2013. 2, 93-101.
- (56) MUSSATTO, S. I., DRAGONE, G., ROBERTO, I. C. Ferulic and p-coumaric acids extraction by alkaline hydrolysis of brewer's spent grain. *Industrial Crops and Products*. 2007. 25, 231-237.
- (57) BAO, Z. J., ZHAO, Y., WANG, X. Y., CHI, Y. J. Effects of degree of hydrolysis (DH) on the functional properties of egg yolk hydrolysate with alcalase. *Journal of Food Science and Technology*. 2017. 54, 669-678.
- (58) HAJAZIMI, E., LANDBERG, R., ZAMARATSKAIA, G. Simultaneous Determination of Flavonols and Phenolic Acids by HPLC-CoulArray in Berries Common in the Nordic Diet. *LWT – Food Science and Technology*. 2016. 74, 128-134.
- (59) KHODDAMI, A., WILKES, M. A., ROBERTS, T. H. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules*. 2013. 18, 2328-2375.

- (60) DURAZZO, A., CASALE, G., MELINI, V., MAIANI, G., ACQUISTUCCI, R. Evaluation of Antioxidant Properties in Cereals: Study of Some Traditional Italian Wheats. *Foods*. 2015. 4, 391-399.
- (61) YU, J., VASANTHAN, T., TEMELLI, F. Analysis of Phenolic Acids in Barley by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001. 49, 4352-4358.
- (62) NARDINI, M., CIRILLO, E., NATELLA, F., MENCARELLI, D., COMISSO, A., SCACCINI, C. Detection of Bound Phenolic acids: prevention by ascorbic acid and ethylenediaminetetraacetic acid of degradation of phenolic acids during alkaline hydrolysis. *Food Chemistry*. 2002. 79, 119-124.
- (63) BAUBLIS, A. J. LU, C., CLYDESDALE, F. M., DECKER, E. A. Potential of Wheat-Based Breakfast Cereals as a Source of Dietary Antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition*. 2000. 19, 3085-3115.
- (64) 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.
- (65) 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.
- (66) 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.
- (67) IURLINA, M. O., FRITZ, R. Characterization of microorganisms in Argentinean honeys from different sources. *International Journal of Food Microbiology*. 2005. 105, 297-304.
- (68) 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.
- (69) 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.
- (70) 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.

- (71) 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.
- (72) 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
- (73) SAKAKIBARA, H., HONDA, Y., NAKAGAWA, S., ASHIDA, H., KANAZAWA, K. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2003. 51, 571-581.
- (74) BUREAU, S., RENARD, C., REICH, M., GINIES CH., AUDERGON, J. M. Change in anthocyanin concentrations in red apricot fruits during ripening. *LWT-Food Science and Technology*. 2009. 42, 372-377.
- (75) SHAABAN, H., GÓRECKI, T. Current trends in green liquid chromatography for the analysis of pharmaceutically active compounds in the environmental water compartments. *Talanta*. 2015. 132, 739-752.
- (76) NÚÑEZ, O., GALLART-AYALA, H., MARTINS, C. P., LUCCI, P. New trends in fast liquid chromatography for food and environmental analysis. *Journal of Chromatography A*. 20121228, 298-323.
- (77) BONTA, R. K. Application of HPLC and ESI-MS techniques in the analysis of phenolic acids and flavonoids from green leafy vegetables (GLVs). *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2017. 7, 349-364.
- (78) FAN, S., ZHAO, P., YU, C., PAN, C., LI, X. Simultaneous determination of 36 pesticide residues in spinach and cauliflower by LC-MS/MS using multi-walled carbon nanotubes-based dispersive solid-phase clean-up. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 2014. 31, 73-82.
- (79) USUI, K., HASHIYADA, M., HAYASHIZAKI, Y., IGARI, Y., HOSOYA, T., SAKAI, J., FUNAYAMA, M. Application of modified QuEChERS method to liver samples for forensic toxicological analysis. *Forensic Toxicology*. 2014. 32, 139-147.

- (80) SHAKOURI, A., YAZDANPANA, H., SHOJAEE, M. H., KOBARFARD, F. Method Development for Simultaneous Determination of 41 Pesticides in Rice Using LC-MS/MS Technique and Its Application for the Analysis of 60 Rice Samples Collected from Tehran Market. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2014. 13, 927-935.
- (81) MASIÁ, A., SUAREZ-VARELA, M. M., LLOPIS-GONZALES, A., PICÓ, Y. Determination of pesticides and veterinary drug residues in food by liquid chromatography-mass spectrometry: A review. *Analytica Chimica Acta*. 2016. 936, 40-61.
- (82) KITTLAUS, S., SCHIMANKE, J., KEMPE, G., SPEER, K. Development and validation of an efficient automated method for the analysis of 300 pesticides in foods using two-dimensional liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2013. 1283, 98-109.
- (83) LACINA, S., ZACHARIASOVA, M., URBANOVA, J., VACLAVIKOVA, M., CAJKA, T., HAJŠLOVA, J. Critical assessment of extraction methods for the simultaneous determination of pesticide residues and mycotoxins in fruits, cereals, spices and oil seeds employing ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2012. 1262, 8-18.
- (84) CIANCIOSI, D., FORBES-HERNÁNDEZ, T. Y., AFRIN, S., GASPARRINI, M., REBOREDO-RODRIGUEZ, P., MANNA, P. P., ZHANG, J., LAMAS, L. B., MARTÍNEZ FLÓREZ, S., TOYOS, P. A., QUILES, J. L., GIAMPIERI, F., BATTINO, M. Phenolic Compounds in Honey and Their Associated Health Benefits: A Review. *Molecules*. 2018. 23, 2322.
- (85) MANYI-LOH, C. E., NDIP, R. N., CLARKE, A. M. Volatile compounds in honey: a review on their involvement in aroma, botanical origin determination and potential biomedical activities. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011 12, 14-32.
- (86) DE-MELO, A. A. M., ALMEIDA-MURADIAN, L. B., SANCHO, M. T., PASCUAL-MATÉ, A. Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. *Journal of Apicultural Research*. 2017. 57, 1-33.
- (87) DONER, L. W. The sugars of honey - a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1977. 28, 443-456.
- (88) SIDDIQUI, I. R. The sugars of honey. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. 1970. 25, 285-309.
- (89) BOGDANOV, S. Honey as Nutrient and Functional Food. *Bee product science*. 2016. 15

- (90) Kamal, M. A., Klein., P. Determination of sugars in honey by liquid chromatography. *Saudi Journal of Biological Science*. 2011. 18, 17-21.
- (91) 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.
- (92) HOLDERNA-KEDZIA, E., KEDZIA, B. Research on an antioxidant capacity of honeys. *Acta Agrobotanica*. 2006. 59, 265-269.
- (93) 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. *LWT*. 2016. 74, 504-513.
- (94) 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.
- (95) 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.
- (96) 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.
- (97) 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.
- (98) 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.
- (99) PITA-CALVO, C., VAZQUEZ, M. Differences between honeydew and blossom honeys: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 2017. 59, 79-87.
- (100) SANTAS, L. A. Species of honeydew producing insects useful to apiculture in Greece. *Entomologia Hellenica*. 1989. 7. 47-48.
- (101) Vyhláška 76/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kakaa s cukrem, čokoládu a čokoládové bonbony.

- (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) SIDDIQUI, A. J., MUSHARRAF, S. G., CHOUDHARY, M. I., ATTA-UR-RAHMAN. Application of analytical methods in authentication and adulteration of honey. *Food Chemistry*. 2017. 217, 687-698.
- (109) GLISZCZYŃSKA-ŚWIGŁO, A., CHMIELEWSKI, J. Electronic Nose as a Tool for monitoring the Authenticity of Food. A Review. *Food Analytical Methods*. 2017. 10, 1800-1816.
- (110) 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.
- (111) GEANA, E. I., CIUCURE, C. T. Establishing authenticity of honey via comprehensive Romanian honey analysis. *Food Chemistry*. 2020. 306, 125595.
- (112) CAN, Z., YILDIZ, O., SAHIN, H., TURUMTAY, E. A., SILICI, S., KOLAYLI, S. An investigation of Turkish honeys: their physico-chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles. *Food Chemistry*. 2015. 180, 133-141.

- (113) 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.
- (114) 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.
- (115) 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.
- (116) GUPTA, J., SHARMA, R. Production technology and quality characteristics of mead and fruit-honey wines: A review. *Natural Product Radiance*. 2009. 8, 345-355.
- (117) NAVRÁTIL, M. A., ŠTURDÍK, E. A., GEMEINER, P. Batch and continuous mead production with pectate immobilised, ethanol-tolerant yeast. *Biotechnology Letters*. 2001. 23, 977-982.
- (118) VIDRIH, R., HRIBAR, J. Mead: The Oldest Alcoholic beverage. In: Kristbergsson, K. Oliveira, J. (ed.). *Traditional Foods. General and Consumer Aspects*. Springer US, Boston, MA. 2016. 325-338.
- (119) ČERMÁKOVÁ T., CHLEBO, R., HUSÁRIKOVÁ M. *Kniha o medu: Historie, léčitelství, kosmetika, gastronomie, tradice, produkty*. Bratislava: Eastone Books, 2010. ISBN: 9788081091322.
- (120) RAMALHOSA, E., GOMEZ, T., PEREIRA, A. P., DIAS, T., ESTEVINHO, L. M. Mead production: Tradition versus modernity. *Advances in Food and Nutrition Research*. 2011. 63, 101-118.
- (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) SROKA, P., TUSZYŃSKI, T. Changes in organic acid contents during mead wort fermentation. *Food Chemistry*. 2007. 104, 1250-1257.
- (124) MCCONNELL, D., SCHRAMM, K. Mead success: Ingredients, processes and techniques. *Zymurgy Spring*. 1995. 4, 33-39.
- (125) AMORIM, T. S., DE BRITO LOPES, S., BISPO, J. A. C., BONAFEC, C. F. S., DE CARVALHO, G. B. M., MARTÍNEZ, E. A. influence of acerola pulp concentration on

- mead production by *Saccharomyces cerevisiae* AWRI 796. *LWT – Food Science and Technology*. 2018. 97, 561-569.
- (126) 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.
- (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) 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.
- (130) CAVACO, T., FIGUEIRA, A. C. Functional properties of Honey and some traditional honey Products from Portugal. In: kristbergsson K., Otlés, S. (ed.). *Functional properties of Traditiona Foods*. Springer US, New York, USA. 2016. 339-352.
- (131) GANGL, H., LOPANDIC, K., TSCHEIK, G., MANDL, S., LEITNER, G., WECHSELBERGER, K., BATUSIC, M., TIEFENBRUNNER, W. Fermentation characteristic od mead and wine generated by yeasts isolated from beehives of two Austrian regions. *BioRxiv*. 2018. 300780.
- (132) Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 110/2008 ze dne 15.1.2008 o definici, popisu, obchodní úpravě, označování a ochraně zeměpisných označení lihovin a o zrušení nařízení rady (EHS) č. 1576/89. Úřední věstník Evropské unie.
- (133) DA SILVA, P. M., GAUCHE, C., GONZAGA, L. V., COSTA, A. C. O., FETT, R. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry*. 2016. 196,309-323.
- (134) Sbírka zákonů České republiky, část 125, 2018, 4274-4312. Vyhláška č. 248/2018 Sb. Ze dne 24. 10. 2018 o požadavcích na nápoje, kvasný ocet a droždí.
- (135) FULEKY, G. *Cultivated plants, primarily as food sources*. Oxford, United Kingdom: EOLSS Publications, 2009. ISBN: 978-1-84826-100-6.
- (136) CAUVAIN, S. P., SALMON, S. S., YOUNG, L. S. *Using Cereal Science and Technology for the Benefit of Consumers: Proceedings of the 12th International ICC Cereal and Bread Congress*. UK: Elsevier, 2005. ISBN: 978-1-845-69063-2.

- (137) SCHOENLECHNER, R., SIEBENHANDL, S., BERGHOFER, E. Pseudocereals. In *Gluten-free cereal products and beverages*. New York, USA: Academic Press. 2008.149–90.
- (138) ALVAREZ-JUBETE, L., ARENDT, E. K., GALLAGHER, E. Nutritive value of pseudocereals and their increasing use as functional gluten-free ingredients. *Trends in Food Science & Technology*. 2010. 21, 106–113.
- (139) PAŚKO, P., BARTOŃ, H., ZAGRODZKI, P., GORINSTEIN, S., FOŁTA, M., ZACHWIEJA, Z. Anthocyanins, total polyphenols and antioxidant activity in amaranth and quinoa seeds and sprouts during their growth. *Food Chemistry*. 2009. 115, 994–998.
- (140) REPO-CARRASCO-VALENCIA, R., HELLSTROM, J. K., PIHLAVA, J. M., MATTILA, P. H. Flavonoids and other phenolic compounds in Andean indigenous grains: Quinoa (*Chenopodium quinoa*), kaniwa ~ (*Chenopodium pallidicaule*) and kiwicha (*Amaranthus caudatus*). *Food Chemistry*. 2010. 120, 128–33.
- (141) ALVAREZ-JUBETE, L., WIJNGAARD, H., ARENDT, E. K., GALLAGHER, E. Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking. *Food Chemistry*. 2010. 119, 770–778.
- (142) VALCÁRCEL-YAMANI, B., DA SILVA LANNES, S. C. Applications of Quinoa (*Chenopodium Quinoa* Willd.) and Amaranth (*Amaranthus* Spp.) and Their Influence in the Nutritional Value of Cereal Based Foods. *Food and Public Health*. 2012. 2, 265–275.
- (143) SCHOENLECHNER, R., JURACKOVA, K., BERGHOFER, E. Pasta production from the pseudocereals amaranth, quinoa and buckwheat. In: *Using Cereal Science and Technology for the Benefit of Consumers, Food Science, Technology and Nutrition 2005*. 74-81. ISBN: 9781845694791.
- (144) VENSKUTONIS, P. R., KRAUJALIS, P. Nutritional Components of Amaranth Seeds and Vegetables: A Review on Composition, Properties, and Uses. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2013. 12, 381–412.
- (145) PRAKASH, S., YADAV., K. Buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) as a Functional Food: A Nutraceutical Pseudocereal. *International Journal of Current Trends in Pharmacobiology and Medical Sciences*. 2016. 1, 1-15.
- (146) HUNT, H., SHANG, X., JONES, M. Buckwheat: a crop from outside the major Chinese domestication centres? A review of the archaeobotanical, palynological and genetic evidence. *Vegetation History and Archaeobotany*. 2018. 27, 493-506.

- (147) IKEDA, K. Buckwheat: composition, chemistry, and processing. *Advances in food and nutrition research*. Academic Press. 2002. 44, 395-434. ISBN: 0-12-016444-2.
- (148) MOUDRÝ J., KALINOVÁ J., PETR J., MICHALOVÁ A. Pohanka a proso. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací. 2005. 20–129.
- (149) WRIGLEY, C. W., CORKE, H., SEETHARAMAN, K., FAUBION, J. *Encyclopedia of food grains*. Second edition. Waltham, MA: Academic Press is an imprint of Elsevier. 2016. 1976. ISBN: 978-0-12-803537-5.
- (150) HAROS, C. M., SCHOENLECHNER, R. *Pseudocereals: Chemistry and Technology*. 1st ed. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2017. ISBN 978-1-118-93828-7.
- (151) Common Buckwheat. AGRI-FACTS [online]. 2001 [cit. 2021-05-01]. Dostupné z: [https://www1.agric.gov.ab.ca/\\$department/deptdocs.nsf/all/agdex103/\\$file/118_20-2.pdf?OpenElement](https://www1.agric.gov.ab.ca/$department/deptdocs.nsf/all/agdex103/$file/118_20-2.pdf?OpenElement).
- (152) KRKOŠKOVÁ, B., MRÁZOVÁ, Z. Prophylactic components of buckwheat. *Food Research International*. 2005, 38, 561–568.
- (153) CHRISTA, K., SORAL-ŠMIETANA, M. Buckwheat Grains and Buckwheat Products – Nutritional and Prophylactic Value of their Components – a Review. *Czech Journal of Food Sciences*. 2008, 26(3), 153–162.
- (154) LIČEN, M., KREFT, I. Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) low molecular weight seed proteins are restricted to the embryo and are not detectable in the endosperm. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2005. 43, 862–865.
- (155) SYTAR, O., CHRASTINOVÁ, L., FERENCOVA, J., POLAČIKOVA, M. Nutrient capacity of amino acids from buckwheat seeds and sprouts. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2018. 57, 38-47.
- (156) BONAFACCIA, G., MAROCCHINI, M., KREFT, I. Composition and technological properties of the flour and bran from common and tartary buckwheat. *Food Chemistry*. 2003. 80, 9-15.
- (157) HSU, CH., CHIANG, B., CHEN, Y., YANG, J., LIU, CH. Improving the antioxidant activity of buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn) sprout with trace element water. *Food Chemistry*. 2008. 108, 633–641.
- (158) DAS, S. *Amaranthus: a promising crop of future*. New York, NY: Springer Berlin Heidelberg, 2016. ISBN: 978-981-10-1468-0.
- (159) JANUSZEWSKA-JÓŹWIAK, K., SYNOWIECKI, J. Characteristics and suitability of amaranth components in food biotechnology. *Biotechnologia*. 2008. 3, 89–102.

- (160) FIDANTSI, A., DOXASTAKIS, G. Emulsifying and foaming properties of amaranth seed protein isolates. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2001. 21, 119–124.
- (161) SILVA-SÁNCHEZ, C., GONZÁLEZ-CASTAÑEDA, J., DE LEÓN-RODRÍGUEZ, A., BARBA DE LA ROSA, A. P. Functional and rheological properties of amaranth albumins extracted from two Mexican varieties. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2004. 59, 169–174.
- (162) CZARNECKA, J., KOZIOŁKIEWICZ, M. 2S albumins-plant storage proteins and food allergens. *Biotechnologia*. 2007. 2, 114–127.
- (163) GORINSTEIN, S., PAWELZIK, E., DELGADO-LICON, E., HARUENKIT, R., WEISZ, M., TRAKHTENBERG, S. Characterisation of pseudocereal and cereal proteins by protein and amino acid analyses. *Journal of the Science of Food Agriculture*. 2002. 82, 886–89.
- (164) ROUČKOVÁ, J., TRČKOVÁ, M., HERZIG, I. The use of amaranth grain in diets for broiler chickens and its effect on performance and selected biochemical indicators. *Czech Journal of Animal Science*. 2011. 49.
- (165) WOLOSİK, K., MARKOWSKA, A. Amaranthus Cruentus Taxonomy, Botanical Description, and Review of its Seed Chemical Composition. *Natural Product Communications*. 2019. 1-10.
- (166) BECKER, R., WHEELER, E. L., LORENZ, K. A compositional study of amaranth grain. *Journal of Food Science*. 1981. 46, 1175–1180.
- (167) VENSĀKUTONIS, P. R., KRAUJALIS, P. Nutritional components of amaranth seeds and vegetables: a review on composition, properties, and uses. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2013. 12, 381–412.
- (168) BURISOVÁ, A., TOMÁŠKOVÁ, B., SASINKOVÁ, V., EBRINGEROVÁ, A. Isolation and characterization of the non-starch polysaccharides of amaranth seeds. *Chemical Papers*. 2001. 55, 254–260.
- (169) CZERWIŃSKI, J., BARTNIKOWSKA, E., LEONTOWICZ, H. Oat (*Avena sativa* L.) and amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) meals positively affect plasma lipid profile in rats fed cholesterol-containing diets. *Journal of Nutrition Biochemistry*. 2004. 15, 622–629.
- (170) WOLSKA, P., CEGLIŃSKA, A., DRABARCZYK, E. Influence of amaranth products addition on quality of wheat bread. *Acta Agrophysica*. 2011. 17, 219–228.

- (171) TANG, Y., TSAO, R. Phytochemicals in quinoa and amaranth grains and their antioxidant, anti-inflammatory, and potential health beneficial effects: a review. *Molecules of Nutrition Food Research*. 2017. 61, 1-16.
- (172) PALOMBINI, SV., CLAUS, T., MARUYAMA, S. A. Evaluation of nutritional compounds in new amaranth and quinoa cultivars. *Food Science of Technology*. 2013. 33, 339–344.
- (173) OGRODOWSKA, D., ZADERNOWSKI, R., CZAPLICKI, S., DEREWIKA, D., WRONOWSKA, B. Amaranth seeds and products – the source of bioactive compounds. *Polish Journal of Food Nutrition Science*. 2014. 64, 165–170.
- (174) EMIRE, S. A., AREGA, M. Value added product development and quality characterization of amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) grown in East Africa. *African Journal of Food Science and Technology*. 2012. 3, 129-141.
- (175) KARAMAĆ, M., GAI, F., LONGATO, E., MEINERI, G., JANIĄK, M. A., AMAROWICZ, R., PEIRETTI, P. G. Antioxidant Activity and Phenolic Composition of Amaranth (*Amaranthus caudatus*) during Plant Growth. *Antioxidants (Basel)*. 2019. 8, 173.
- (176) PAŚKO, P., M. SAJEWICZ, S. GORINSTEIN a Z. ZACHWIEJA. Analysis of selected phenolic acids and flavonoids in *Amaranthus cruentus* and *Chenopodium quinoa* seeds and sprouts by HPLC. *Acta Chromatographica*. 2008. 20, 661-672.
- (177) KLIMCZAK, I., MAŁECKA, M., PACHOLEK, B. Antioxidant activity of ethanolic extracts of amaranth seeds. *Nahrung/Food*. 2002. 46, 184–186.
- (178) PEIRETTI, P. G., MEINERI, G., GAI, F., LONGATO, E., AMAROWICZ, R. Antioxidative activities and phenolic compounds of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seeds and amaranth (*Amaranthus caudatus*) grain extracts. *Natural Product Research*. 2017. 31, 2178–2182.
- (179) VOLLMANNOVÁ, A., MARGITANOVÁ, E., TÓTH, T., TIMORACKÁ, M., URMINSKÁ, D., BOJŇANSKÁ, T., ČIČOVÁ, I. Cultivar Influence on Total Polyphenol and Rutin Contents and Total Antioxidant Capacity in Buckwheat, Amaranth, and Quinoa Seeds. *Czech Journal of Food Sciences*. 2013. 31, 589–595.
- (180) PERALES-SÁNCHEZ, J. X. K., REYES-MORENO, C., GÓMEZ-FAVELA, M. A., MILÁN-CARRILLO, J., CUEVAS-RODRÍGUEZ, E. O., VALDEZ-ORTIZ, A., GUTIÉRREZ-DORADO, R. Increasing the Antioxidant Activity, Total Phenolic and Flavonoid Contents by Optimizing the Germination Conditions of Amaranth Seeds. *Plants Foods for Human Nutrition*. 2014. 69, 196–202.

- (181) LÓPEZ-MEJÍA, O. A., LÓPEZ-MALO, A., PALOU, E. Antioxidant capacity of extracts from amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) seeds or leaves. *Industrial Crops and Products*. 2014. 53, 55–59.
- (182) OZSOY, N., YILMAZ, T., KURT, O., CAN, A., YANARDAG, R. In vitro antioxidant activity of *Amaranthus lividus* L. *Food Chemistry*. 2009. 116, 867-872.
- (183) KUMAR, B. R. Application of HPLC and ESI-MS techniques in the analysis of phenolic acids and flavonoids from green leafy vegetables (GLVs). *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2017. 7, 349–364.
- (184) BARBA DE LA ROSA, A. P., DE LEÓN-RODRÍGUEZ, A., LAURSEN, B., FOMSGAARD, I. S. Influence of the growing conditions on the flavonoids and phenolic acids accumulation in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) leaves. *Revista terra latinoamericana*. 2019. 37, 449–457.
- (185) DZIADEK, K., KOPEĆ, A., PIĄTKOWSKA, E., LESZCZYŃSKA, E., PISULEWSKA, E., WITKOWICZ, R., BYSTROWSKA, B., FRANC, R. Identification of polyphenolic compounds and determination of antioxidant activity in extracts and infusions of buckwheat leaves. *European Food Research and Technology*. 2018. 244, 333–343.
- (186) MANSUR, A. R., KIM, K. J., KIM, D. B., YOO, M., YANG, H. W., KIM, D. O., NAM, T. G. Matrix solid-phase dispersion extraction method for HPLC determination of flavonoids from buckwheat sprouts. *LWT*. 2020. 133, 110121.
- (187) ANDERSEN, Ø. M., MARKHAM, K. R. *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. 1st ed. Boca Raton: CRC Press: Taylor & Francis Group, 2006. ISBN: 9780849320217.
- (188) NIREESHA, G. R., DIVYA, L., SOWMYA, C., VENKATESHAN, N., BABU, M. N., LAVAKUMAR, V. Lyophilization/Freeze Drying - An Review. *International Journal of novel Trends in Pharmaceutical Sciences*. 2013. 3, 87–98.
- (189) DRZEWIECKI, J., MARTINEZ-AYALA, A. L., LOZANO-GRANDE, M. A., LEONTOWICZ, H., LEONTOWICZ, M., JASTRZEBSKI, Z., PASKO, P., GORINSTEIN, S. In Vitro Screening of Bioactive Compounds in some Gluten-Free Plants. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2018. 1–14.
- (190) BIESAGA, M., PYRZYŃSKA, K. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry studies of the phenolic compounds in honey. *Journal of Chromatography A*. 2009. 1216, 6620-6626.

- (191) ĐORĐEVIĆ, T. M., ŠILER-MARINKOVIĆ, S. S., DIMITRIJEVIĆ-BRANKOVIĆ, S. I. Effect of fermentation on antioxidant properties of some cereals and pseudo cereals. *Food Chemistry*. 2010. 119, 957–963.
- (192) 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.
- (193) STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*. 2007. 30, 3268–3295.
- (194) CARRASCO-SANDOVAL. J., REBOLLEDO, P., PETERSSEN-FONSECA, D., FISCHER, S., WILCKENS, R., ARANDA, M., HENRÍQUEZ-AEDO, K. A fast and selective method to determine phenolic compounds in quinoa (*Chenopodium quinoa* Will) seeds applying ultrasound-assisted extraction and high-performance liquid chromatography. *Chemical Papers*. 2021. 75, 431–438.
- (195) MIKULAJOVÁ, A., ŠEDIVÁ, D., HYBENOVÁ, E., MOŠOVSKÁ, S. Buckwheat cultivars – phenolic compounds profiles and antioxidant properties. *Acta Chimica Slovaca*. 2016. 9, 124–129.
- (196) PAUCAR-MENACHO, L. M., PEÑAS, E., DUEÑAS, M., FRIAS, J., MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C. Optimizing germination conditions to enhance the accumulation of bioactive compounds and the antioxidant activity of kiwicha (*Amaranthus caudatus*) using response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*. 2017. 79, 245–252.
- (197) KIPROVSKI, B., MIKULIC-PETKOVSEK, M., SLATNAR, A., VEBERIC, R., STAMPAR, F., MALENCIC, D., LATKOVIC, D. Comparison of phenolic profiles and antioxidant properties of European *Fagopyrum esculentum* cultivars. *Food Chemistry*. 2015. 185, 41–47.
- (198) QUETTIER-DELEU, C., GRESSIER, B., VASSEUR, J., DINE, T., BRUNET, C., LUYCKX, M., CAZIN, M., CAZIN, J. C., BAILLEU, B., TROTIN, F. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000. 72, 35–42.
- (199) OGRODOWSKA, D., CZAPLICKI, S., ZADERNOWSKI, R., MATTILA, P., HELLSTRÖM, J., NACZK, M. Phenolic acids in seeds and products obtained from *Amaranthus cruentus*. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2012. 51, 96–101.

- (200) BUNZEL, M., RALPH, J., STEINHART, H. Association of non-starch polysaccharides and ferulic acid in grain amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) dietary fiber. *Molecular Nutrition Food Research*. 2005. 49, 551–559.
- (201) STEFFENSEN, S. K., RINNAN, A., MORTENSEN, A. G., LAURSEN, B., DE TROIANI, R. M., JANOVSKA, D., DUSEK, K., DÉLANO-FRIER, J., TABERNER, A., CHRISTOPHERSEN, C., FOMSGAARD, I. S. Variations in the polyphenol content of seeds of field grown *Amaranthus* genotypes. *Food Chemistry*. 2011. 129, 131–138.
- (202) HATAMIANA, M., NOSHADA, M., ABDANAN-MEHDIZADEH, S., BARZEGARA, H. Effect of roasting treatment on functional and antioxidant properties of chia seed flours. *NFS Journal*. 2020. 21, 1-8.
- (203) GHARAATI JAHROMI, S. Extraction Techniques of Phenolic Compounds from Plants. *Plant Physiological Aspects of Phenolic Compounds*. IntechOpen, 2019. DOI: 10.5772/intechopen.84705.
- (204) CAI, Y., LUO, Q., SUN, M. CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*. 2004. 74, 2157–2184.
- (205) ZHU, N., SHENG, S., LI, D., LAVOIE, E. J., KARWE, M. V., ROSEN, R. T., HO, C.-T. Antioxidative flavonoid glycosides from quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd). *Journal of Food Lipids*. 2001. 8, 37–44.
- (206) PAUCAR-MENACHO, L. M., DUEÑAS, M., PEÑAS, E., FRIAS, J., MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C. Effect of Dry Heat Puffing on Nutritional Composition, Fatty Acid, Amino Acid and Phenolic Profiles of Pseudocereals Grains. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 2018. 68, 103–113.
- (207) DINI, I., TENORE, G. C., DINI, A. Phenolic constituents of *Kancolla* seeds. *Food Chemistry*. 2004. 84, 163–168.
- (208) STARZYŃSKA-JANISZEWSKA, A., STODOLAKA, B., GÓMEZ-CARAVACA, S. M., MICKOWSKA, B., MARTIN-GARCIA, B., BYCZYŃSKI, L. Mould starter selection for extended solid-state fermentation of quinoa. *LWT*. 2019. 99, 231-237.
- (209) PILCO-QUESADA, S., TIAN, Y., YANG, B., REPO-CARRASCO-VALENCIA, R., SUOMELA, J. Effects of germination and kilning on the phenolic compounds and nutritional properties of quinoa (*Chenopodium quinoa*) and kiwicha (*Amaranthus caudatus*). *Journal of Cereal Science*. 2020. 94, 102996.
- (210) ARIGO, A., ČESLA, P., ŠILAROVÁ, P., CALABRO, M. L., ČESLOVÁ, L. Development of extraction method for characterization of free and bonded polyphenols in

barley (*Hordeum vulgare* L.) grown in Czech Republic using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*. 2018, 245, 829-837.

(211) MELOUN, M., MILITKÝ, J. *Interaktivní statistická analýza dat*. Karolinum: Praha, 2012. ISBN: 978-80-246-2173-9.

2 STANOVENÍ PESTICIDŮ VE VODÁCH, MEDU, MEDOVINÁCH A V OVOCI

2.1 PESTICIDY

FAO (Food and Agriculture Organization) formuluje pojem pesticid jako organickou nebo anorganickou sloučeninu případně jejich směs, která se využívá především v zemědělském průmyslu a slouží jako prevence před výskytem nežádoucích organismů (plevelé, škůdci atd.). Obecně lze tedy pesticidy považovat za sloučeniny toxického charakteru, které hubí vybrané živé organismy [1].

2.1.1 Klasifikace pesticidů

Pesticidy se dělí do vybraných tříd dle několika rozdílných kritérií. Podle způsobu proniknutí účinné látky k nežádoucímu organismu se klasifikují na kontaktní, systémové, kombinované a kvazi-systémové. Pod toto rozdělení se řadí pouze pesticidy, které jsou využívány k hubení rostlinných plevelů, z nichž nejvýznamnější skupinu tvoří herbicidy [2-4]. V případě kontaktních pesticidů se účinná látka aplikuje postřikem na vybrané místo a nedochází k transportu pomocí cévních svazků, proto je doba mezi aplikací přípravku a sklizní vybrané plodiny výrazně kratší v porovnání se systémovými pesticidy. Účinnost kontaktních pesticidů závisí na klimatických podmínkách a hlavní nevýhodou je aplikace pesticidu na špatně dostupná místa (husté porosty, spodní strana listů atd.). Systémové pesticidy jsou transportovány pomocí cév do celého systému rostlin. Kutikulární přenesení pesticidu se dělí na akropetální (od kořenového systému nahoru) a bazopetální (od vrchní části rostliny dolů). Kombinované využívají kombinaci systémových i kontaktních pesticidů a jejich hlavní výhodou je vyšší účinnost. Poslední skupinou jsou kvazi-systémové pesticidy, kde se účinná látka nakumuluje na vnější straně listů (v kutikule) a následně se odpařuje [5].

Dalším kritériem klasifikace pesticidů je jejich původ. Pesticidy mohou být přírodní nebo syntetické, přičemž přírodní jsou považovány za méně škodlivé a dají se použít opakovaně. Syntetické pesticidy jsou vyrobeny v laboratořích a představují daleko větší ekologické riziko. Mezi nejvýznamnější zástupce syntetických pesticidů patří organofosforové pesticidy (karbamátové, organochlorové, organofosfátové a pyrethroidové) a do kategorie přírodních řadíme mikrobiální a biochemické pesticidy a protektanty inkorporované do rostlin [4].

V neposlední řadě dělíme pesticidy podle typu cílových nežádoucích organismů na zoocidy, herbicidy a fungicidy. Zoocidy jsou pesticidy zaměřené na živočichy a zahrnují několik podskupin: nematocidy, insekticidy, moluskocidy, rodenticidy a avicidy. Nejvýznamnější skupinou zoocidů jsou insekticidy, které jsou dále děleny na akaricidy, aficidy, ovicidy a larvicidy. Kromě základní klasifikace je zde i několik speciálních tříd, mezi které patří algicidy, arboricidy a antimikrobiální pesticidy (virucidy a baktericidy). Herbicidy jsou látky, které se používají k hubení plevelů a likvidují veškeré rostliny. Mezi nejvýznamnější zástupce se řadí chlorečnan sodný. Další skupinou, která je podrobněji popsána v následujících podkapitolách, jsou fungicidy, které se využívají k hubení plísní a chorob. V této kapitole budou popsány pouze třídy pesticidů, které souvisí s experimentální částí práce [1-4].

Insekticidy

Insekticidy jsou pesticidy s neurotoxickým účinkem využívané pro likvidaci hmyzu a dalších členovců. Hubení škůdce probíhá dýchacími cestami, trávicí soustavou nebo povrchem těla, kdy dojde k ochrnutí centrálního nervového systému. Lze je rozdělit na přírodní a syntetické. Mezi přírodní patří nikotin, rotenon a pyrethrum a mezi syntetické organochlorové, karbamátové, organofosforové a pyrethroidové pesticidy [1-5].

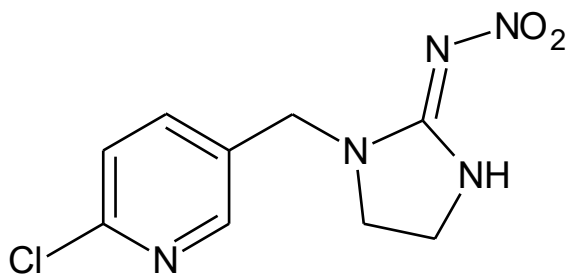
- **Neonikotinoidy**

Neonikotinoidy jsou chemicky odvozené od nikotinu a jejich účinek závisí na chemické struktuře. Dělí se do tří skupin na N-nitroguanidiny, N-kyanoguanidiny a nitromethyleny. Tyto skupiny se liší toxicitou, kdy N-kyanoguanidiny jsou méně toxické než N-nitroguanidiny a nitromethyleny [6,7]. Výhoda neonikotinoidních insekticidů v případě hubení škůdců je jejich rozpustnost ve vodě, která usnadňuje přístup do půdy a transport rostlinami pomocí cévních svazků [8], ale zároveň může způsobit i kontaminaci podzemních vod [9]. Rozpustnost neonikotinoidů ve vodách závisí na vlastnostech vybraného pesticidu, teplotě a pH vody [10]. Tyto pesticidy se využívají k ošetření obilovin, řepky a cukrové řepy. Původně bylo komerčně dostupných 7 neonikotinoidových insekticidů: imidaklopid, acetamiprid, dinotefuran, thiaklopid, thiamethoxam, nitenpyram a klothianidin [4]. Ovšem jejich použití bylo negativně spojeno s ekologickými účinky na včelu medonosnou, a to hlavně v případech neonikotinoidů obsahujících nitro skupinu (imidaclopid, thiamethoxam, clotianidin), které jsou nejtoxičtější. Proto v únoru 2018 zveřejnil Evropský úřad pro bezpečnost potravin novou zprávu, kde poukazuje na nebezpečí neonikotinoidů pro včely. V dubnu 2018 se členské státy Evropské unie rozhodly zakázat ve venkovním prostředí použití tří hlavních neonikotinoidů (klothianidin,

imidaklopid a thiamethoxam). V roce 2020 byl zakázán i thiaklopid. Dnes tedy lze legálně využívat pouze acetamiprid [5,6,7,11].

Imidaklopid

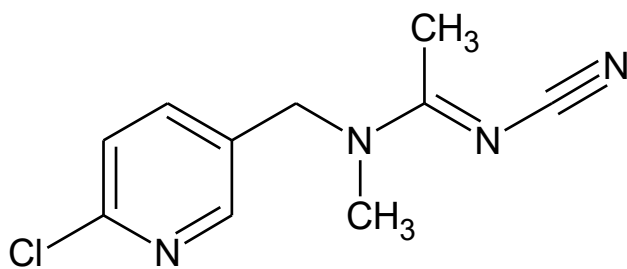
Tento insekticid se systematickým názvem 1-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-N-nitroimidazolidin-2-ylideneamin (obrázek 30) patří mezi N-nitroguanidiny a byl schválen pro ochranu 140 plodin ve více než 120 zemích. Imidaklopid je řazen mezi systémové insekticidy, které blokují nikotinové acetylcholinové receptory, a způsobuje otevření sodíkových kanálů, což vede ke smrti hmyzu. Poločas rozpadu imidaklopidu v půdě se pohybuje od 18 do 31 dnů, v závislosti na podmínkách prostředí. Ze všech vybraných neonikotinoidů je dokonce považován za nejvíce toxický a předpokládá se, že použití imidaklopidu je zodpovědné za celosvětový pokles populací včely medonosné [12].



Obrázek 30: Struktura imidaklopidu.

Acetamiprid

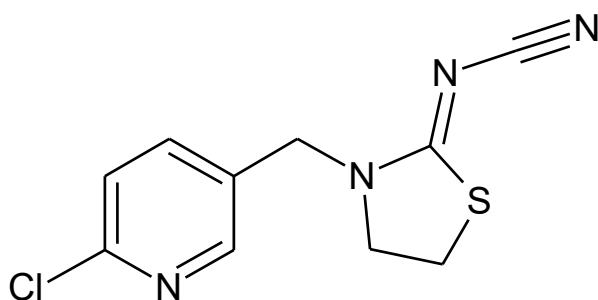
Struktura acetamipridu (N-[(6-chlor-3-pyridyl)methyl]-N'-kyano-N-methylacetamidin) je znázorněna na obrázku 31. Acetamiprid je řazen do chloronikotinylové podtřídy neonikotinoidových pesticidů a obsahuje kyanoguanidinový zbytek, který je farmakoforem. Zajímavou charakteristikou acetamipridu jako zástupce N-kyano-substituovaných neonikotinoidů je, že na rozdíl od N-nitro-substituovaných isonikotinoidů jako jsou např. clothianidin, dinotefuran, imidaclopid, thiamethoxam nebo nitenpyram, je méně toxický pro včely medonosné. Jeho poločas rozpadu v půdě se pohybuje v rozmezí od 1 do 9 dní [13,14].



Obrázek 31: Struktura acetamipridu.

Thiaklopid

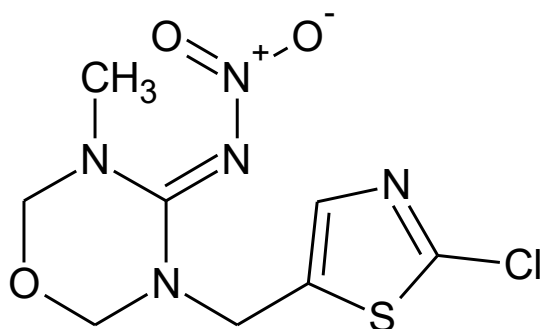
Thiaklopid (obrázek 32) je neurotoxický insekticid využívaný ve více než 50 zemích. Řadí se mezi N-kyanoguanidiny, proto je v porovnání s ostatními neonikotinoidy méně toxický pro včely. Jako všechny neonikotinoidy působí na nervový systém hmyzu jako agonista nikotinového acetylcholinového receptoru (nAChR). Vykazuje vysokou rozpustnost ve vodě a jeho poločas rozpadu v půdě je 11 až 27 dnů. V roce 2018 byl thiaklopid zakázán ve Francii a v roce 2020 nebylo schváleno ani jeho používání v souladu s nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1107/2009 o uvedení léčivých přípravků na trh z hlediska ochrany rostlin na trhu [14-16].



Obrázek 32: Struktura thiaklopidu.

Thiamethoxam

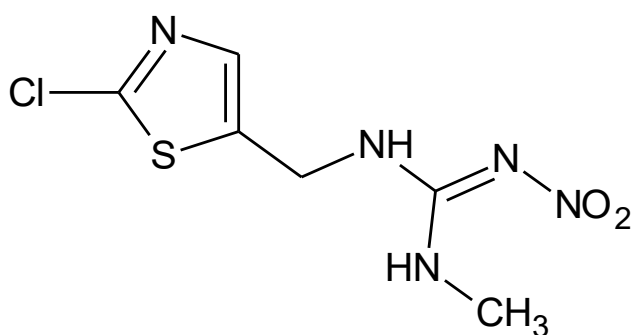
Thiamethoxam (obrázek 33) je první komerční neonikotinoidový insekticid z thianikotinylové podtřídy, který byl objeven v roce 1985. Během zkoumání nových variací nitroimino-heterocyklu imidaclopridu, vykazovaly 4-nitroimino-1,3,5-oxadiazinany vysokou insekticidní aktivitu a z nich byl nakonec thiamethoxam identifikován a vybrán jako nejlepší sloučenina pro celosvětový vývoj. Vyznačuje se výjimečnými charakteristikami a poskytuje kontrolu nad širokou škálou komerčně významných škůdců (mšice, molice, třásněnky, brouci a drátovci a některé druhy lepidopteranů). Kromě toho slouží jako prevence pro přenos některých virů. Thiamethoxam byl vyvinut jak pro aplikace na list nebo půdu, tak i jako ošetření osiva pro většinu zemědělských plodin po celém světě. Mezi jeho výhody patří nízké dávkování, flexibilní metody aplikace, vynikající účinnost, dlouhotrvající zbytková aktivita a příznivý bezpečnostní profil [17].



Obrázek 33: Struktura thimethoxanu.

Klothianidin

Klothianidin, C(E)-N-((2-chlor-5-thiazolyl)methyl)-N-dimethyl-N-nitroguanidin, znázorněný na obrázku 34, je primární metabolit thiamethoxamu a derivát nitroguanidinu. Klothianidin se řadí mezi nejnovější členy skupiny chlornikotinylových insekticidů, jejichž nejčastější využití je aplikace postřiku na list a ošetření semen. Do zákazu v roce 2018 byl klothianidin registrován ve více než 40 zemích. Vykazuje nízkou toxicitu a vysokou selektivitu proti širokému spektru hmyzu, včetně sajícího a žracího hmyzu a některých lepidopteranů. Během výzkumu v oblasti neonicotinoidních insekticidů byl nejprve připraven nitenpyram (derivát nitromethylenu s otevřeným řetězcem), který vykazoval silnou aktivitu proti škůdcům *Hemiptera* a *Thysanoptera* a jeho modifikace vedla k syntéze klothianidinu (derivát nitroguanidinu). Klothianidin se váže s vysokou afinitou na nikotinové receptory hmyzu. Je zajímavé, že klothianidin vykazuje zvýšenou agonistickou účinnost na cholinergní neurony kultivované z centrálního nervového systému larev ve srovnání s imidaclopridem [18,19].



Obrázek 34: Struktura klothianidinu.

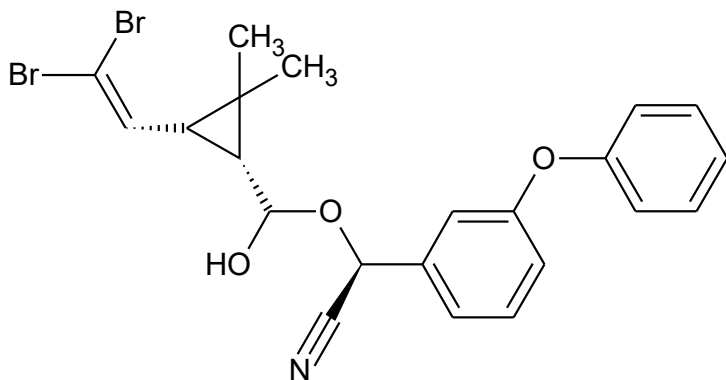
Pyrethroidy

Pyrethroidní insekticidy jsou odvozeny od pyrethrinů neboli přírodních insekticidů, které se nacházejí v květinách chryzantém. Pyrethryny jsou estery cyklopropankarboxylové kyseliny a cyklopentenolonového alkoholu, které byly synteticky modifikovány tak, aby zvýšily

insekticidní účinnost a prodloužily životnost insekticidu v přítomnosti vody, vlhkosti a slunečního světla. Chemické struktury pyrethroidů jsou podobné a zachovávají si složení esenciálních kyselin nebo alkoholu pyrethrinů. Z geografického hlediska existuje více než 12 registrovaných pyrethroidů, které se používají v zemědělství nebo veterinárních a lékařských aplikacích. Mezi nejznámější patří deltamethrin a T-fluvalinát [20].

Deltamethrin

Deltamethrin, (S)-alfa-kyano-3-fenoxybenzyl-(1R)-cis-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-dimethylcyklopropankarboxylát (obrázek 35), je syntetický pyrethroid typu II, který se používá jako insekticid a akaricid na celém světě. Je to jeden z nejúčinnějších známých insekticidů a je široce používán k potlačení širokého spektra ektoparazitů (vši, mouchy a klíšťata). Slouží jako prevence před škůdci a parazity v suchozemských a akvakulturních živočišných průmyslech. V Indii a dalších rozvojových zemích WHO (Světová zdravotnická organizace) se deltamethrin využívá při výrobě insekticidních moskytiér, kde působí na komáry, které přenášejí virus Zika a virus Dengue. Omezením prodeje insekticidů na bázi organofosforu se výrazně zvýšilo užívání pyrethroidů v oblasti zemědělství [21].

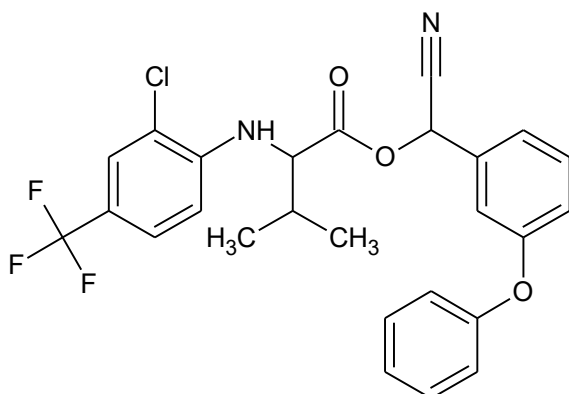


Obrázek 35: Struktura deltamethrinu.

T-fluvalinát

T-fluvalinát ((RS)- α -kyano-3-fenoxybenzyl N-(2-chlor- α,α,α -trifluor-p-tolyl)-D-valinát, obrázek 36) patří mezi syntetické pyrethroidní pesticidy. Jedná se o stabilní, netěkavou látku, která se obvykle používá k hubení zemědělských škůdců. Jeho základní charakteristiky jsou vysoká účinnost, krátkodobá reziduální aktivita a nízká toxicita pro savce. Je vysoce účinný proti roztočům rodu *Varroa*. T-fluvalinát je aktivní složkou komerčních přípravků Apistan, Mavrik a Klartan, z nichž pouze Apistan je schválen pro včelařské využití, zatímco ostatní se používají pouze v zemědělství. T-fluvalinát je od roku 1988 celosvětově používán k prevenci

varrózy. Množství T-fluvalinátu aplikovaného v každé kolonii se liší podle použité aplikační techniky. Doporučenou aplikací je umístění dvou proužků Apistan (800 mg AI na proužek) do kolonie po dobu 4–8 týdnů, jednou nebo dvakrát ročně [22,23].



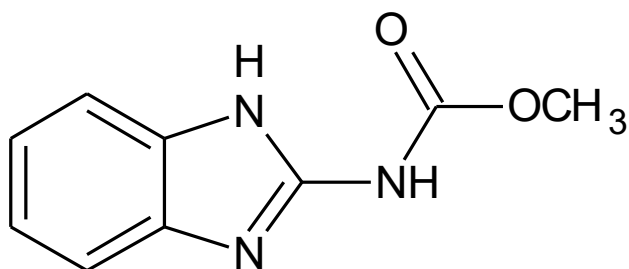
Obrázek 36: Struktura T-fluvalinátu.

Fungicidy

Fungicidy jsou pesticidy využívané pro hubení či inhibici růstu hub, plísní, jejich spor a onemocnění s nimi souvisejícími. Nejběžnější účinná látka fungicidů je měď. Lze je dělit na přírodní a syntetické. Z hlediska struktury klasifikujeme fungicidy na benzimidazoly, N-arylkarbamáty, acylalaniny a fungicidy jim příbuzné, anilinopyrimidiny, organofosfáty a fungicidy jim příbuzné, probenazol, dikarboimidy, phenylpyrroly, arylkarboxanilidy, methoxy-akryláty a látky jim příbuzné a nehomogenní skupinu látek, která není řazena do jmenovaných kategorií [24].

Karbendazim

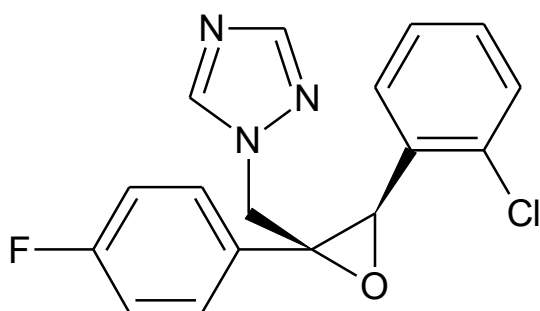
Karbendazim (methyl N-(1H-benzimidazol-2-yl)karbamát, obrázek 37) je širokospektrální fungicid, který se používá v zemědělství u ekonomicky významných plodin. Aplikuje se na semena, listy a plody po sklizni. Způsob účinku karbendazimu je založen na inhibici polymerace mikrotubulů v buňkách prostřednictvím β -tubulinu, což způsobuje narušení mikrotubulů a segregace chromozomů během dělení buněk. Dále souvisí s hlavními lidskými chorobami, jako je rakovina a u některých savců vyvolává embryotoxicitu, apoptózu zárodečných buněk, teratogenezi, neplodnost, hepatocelulární dysfunkci, hematopoézu a vývojovou toxicitu. Karbendazim je výsledek degradace benomyly a thiofanát-methylu, což jsou další fungicidy běžně používané v zemědělství. V závislosti na okolním prostředí je poločas rozpadu přibližně 3 dny až 12 měsíců [25].



Obrázek 37: Struktura karbendazimu.

Epoxykonazol

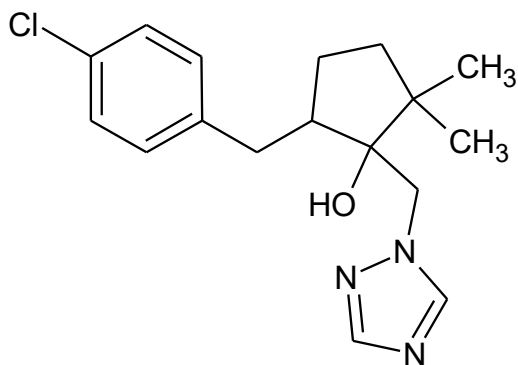
Epoxykonazol (cis-1-[[3-(2-chlorfenyl)-2-(4-fluorfenyl) oxiranyl] methyl]-1H-1,2,4-triazol, obrázek 38) je triazolový fungicid. Působí jako inhibitor biosyntézy ergosterolu, čímž narušuje syntézu buněčné membrány hub. Používá se jako širokospektrální fungicid s preventivním a léčebným účinkem z hlediska kontroly chorob způsobených vřeckovýtusnými, stopkovýtusnými a nedokonalými houbami v obilovinách, cukrové řepě, arašidech, řepce olejné, jablkách a okrasných rostlinách [26]. Je vysoce účinný i při nízkých aplikačních dávkách 25–125 g [27].



Obrázek 38: Struktura epoxykonazolu.

Metkonazol

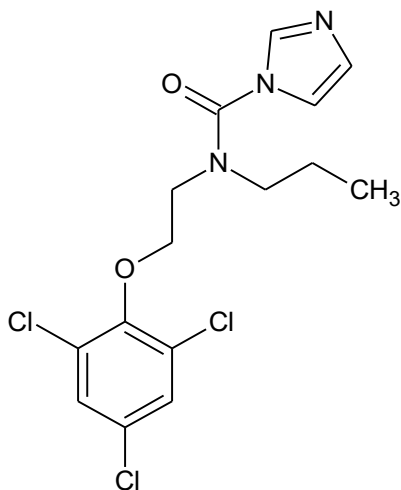
Metkonazol (5-(4-Chlorbenzyl)-2,2-dimethyl-1-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)cyklopentanol, obrázek 39) je inhibitor demethylace ergosterolu, který byl vyvinut v roce 1992 a používá se při hubení rzi pšeničných listů a Braničnatky pšeničné atd. Obsahuje dvě chirální uhlíková centra, dva páry enantiomerů a dva diastereoisomerní páry. Je stabilní ve vodném prostředí s poločasem rozpadu 1-15 dní a 116-814 dnů ve vodě, respektive v sedimentech. Jeho perzistence a akumulace v necílových organismech je velmi vysoká. [28].



Obrázek 39: Struktura metconazolu.

Prochloraz

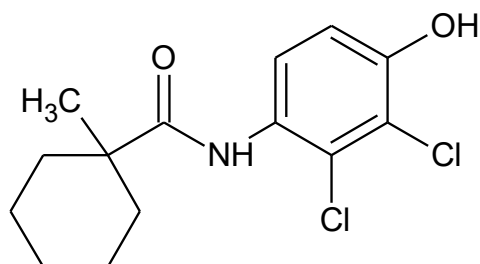
Prochloraz (N-propyl-N-[2-(2,4,6-trichlorfenoxy) ethyl] imidazol-1-karboxamid, obrázek 40) je imidazolový fungicid, který se používá k ochraně rostlin vůči širokému spektru hub, jako je *Magnaporthe oryzae*. Narušuje syntézu ergosterolu inhibicí cytochromu P450 (CYP) 14 α -demethylázy (CYP51) prostřednictvím interakce se železem v hemovém kofaktoru, čímž účinně oslabuje buněčné membrány hub. Prochloraz je považován za sloučeninu narušující endokrinní systém, protože je antagonistou androgenního receptoru [29,30].



Obrázek 40: Struktura prochlorazu.

Fenhexamid

Fenhexamid (N- (2,3-dichlor-4-hydroxyfenyl) methylcyklohexankarboxamid, obrázek 41) je fungicid, který patří do skupiny derivátů hydroxyanilidů a představuje hlavní účinnou látku komerčně dostupného fungicidního přípravku TELDOR 500. Je schopen inhibovat enzym methylsterol monooxygenázy, který katalyzuje nezbytnou biosyntézu sterolu v několika zemědělsky významných plísních, zejména z rodu *Botrytis* [31].



Obrázek 41: Struktura fenhexamidu.

2.1.2 Izolace pesticidů

Pesticidy se izolují z matrice pomocí extrakce organickým rozpouštědlem (případně směsí více rozpouštědel). Volbu rozpouštědla ovlivňuje vlhkost, obsah lipidů a polarita reziduí. Polární rozpouštědla jako je methanol, aceton nebo acetonitril se využívají při nižší koncentraci lipidů a vyšší vlhkosti. Při izolaci pesticidů se nejčastěji využívá metod SPE, LLE, QuEChERS a SFE. Během LLE extrakce je pro lepší homogenizaci vzorku med zředěn vodou případně směsí vody a rozpouštědla. Pesticidy jsou extrahovány dle své polarita. Pro zvýšení účinnosti extrakce se vzorek často okyseluje. Pomocí SPE lze najednou zpracovat více vzorků a je zde možnost i automatizace procesu. Další variantou je metoda QuEChERS. Metoda se skládá ze dvou základních kroků, nejprve dojde k extrakci pesticidu ze vzorku medu pomocí acetonitrilu a roztoku solí. Celá směs se odstředí a následuje přečištění organické fáze z prvního kroku pomocí disperzní SPE. Další variantou je SFE. Její využití v oblasti polárních pesticidů je ovšem minimální [32-36].

2.1.3 Pesticidy v životním prostředí

Životní prostředí je znečištěno již při produkci a transportu pesticidů. Ekosystém ovlivňují nejčastěji přímou aplikací, což je jejich využívání v zemědělství, vodním hospodářství, veřejném zdravotnictví a hygieně. Hlavním zdrojem kontaminace přímou aplikací jsou zemědělci a dřevařský průmysl. Nepřímá aplikace znamená kontaminace

ze samotné rostliny. Styk rostliny s vodou způsobuje kontaminaci do spodních a povrchových vod. Pesticidy, které lze najít v povrchových vodách, pocházejí z odtoků, atmosférické depozice nebo z vypouštění odpadních vod. Do podzemních vod se zase pesticidy dostávají především z ošetřených oblastí (pole), místa likvidace odpadů a místa výroby pesticidů. Další variantou kontaminace je odpaření pesticidu, který kondenzuje a pomocí srážek se vrátí znovu na zem. Kromě odpaření dochází i k degradaci půdou při postřiku pesticidu na rozsáhlé rovinné plochy nebo znečištění erozivní činností větru. Obecně platí, že pesticidy vstupují do hydrologického cyklu především ztrátami povrchu a vyluhováním přes půdní vrstvy a podle charakteru pesticidu (poločas rozpadu, teplota tání/varu, tlak par, rozdělovací koeficienty, rozpustnost ve vodě atd.) mohou způsobit kontaminaci. Podle poločasu rozpadu klasifikujeme pesticidy na neperzistentní, středně perzistentní a vysoce perzistentní. I přes použití pesticidů podle pravidel správné zemědělské praxe (GAP), je zde možnost kontaminace i dalších necílových organismů. Koncentraci pesticidů ve vybraných produktech stanovují maximální limity reziduí (MRL). V případě vyšší koncentrace Státní zemědělská a potravinářská inspekce zakáže prodej a distribuci potravin [37-42].

2.1.4 Pesticidy v medu a ovlivnění včel

Včelstva jsou kontaminována zejména neonikotinoidními insekticidy, které jsou pro ně velice nebezpečné. Mezi nejvíce toxické patří klothianidin, thiamethoxam, trifloxystrobin a azoxystrobin. Hlavním zdrojem přenosu pesticidu na včelu je vylučování vody povrchem rostliny [43,44]. Dalším zdrojem kontaminace medu pomocí pesticidů mohou být také včelaři, jelikož uvnitř úlu se často používají různé látky k prevenci a eliminaci běžných škůdců [45]. Nepřímá kontaminace medu může být způsobena aplikací pesticidů v zemědělství, půdě, ovzduší, vodě a květinách, kde včely shromažďují nektar za účelem výroby medu [46]. Med nemá žádné specifické limity pro rezidua pesticidů. Pesticidy jsou nebezpečné jak pro včely, tak pro člověka. Používání pesticidů v životním prostředí by proto mělo být sledováno a med by měl být kontrolován zavedenými analytickými metodami [47].

2.1.5 Stanovení pesticidů ve vodě a v biologických matricích

Ke stanovení pesticidů ve vodě a biologických matricích se používá několik analytických metod. Prvním základním krokem v jejich analýze je příprava vzorku za účelem obohacení monitorovaných pesticidů, které je nezbytné především v případě vzorků vod, kde se pesticidy nacházejí v nízké koncentraci [48]. Nejběžnějšími extrakčními technikami jsou LLE [49,50], SPE [51], SLE [52] a QuEChERS [53-55]. Dále jsou testovány miniaturizované techniky, jako

je disperzní mikroextrakce kapalina – kapalina (DLLME) [56], mikroextrakce pomocí plněného tuhého sorbentu (SBSE) [57], mikroextrakce na pevné fázi (SPME) [58,59], sorpční extrakce míchadlem (MEPS) [21], mikroextrakce do jedné kapky rozpouštědla (SDME) [60] a extrakce magnetickou tuhou fází [61]. Nejběžnějšími porézními materiály pro izolaci pesticidů ve vodě jsou oxid hlinitý, železo [62], uhlík [63] a oxid křemičitý [64]. Dalším využívaným sorbentem jsou vícestěnné uhlíkové nanotrubky (MCWCNT), jejichž hlavní výhodou je vyšší schopnost eliminace reziduí pesticidů a ochrana životní prostředí v porovnání s jinými adsorbenty, jako jsou nanočástice oxidu křemičitého [65-67], magnetické materiály [68], organické porézní polymery [69] a nanočástice oxidu hlinitého [70-72]. Další variantou obohacovacího kroku je extrakce na magnetické tuhé fázi (MSPE), která je založená na adsorpci a uvolňování cílových analytů malým množstvím magnetických nanočástic rozptýlených v roztoku. Cílové sloučeniny adsorbované magnetickými nanočásticemi lze snadno sbírat pomocí externího magnetického pole bez další centrifugace nebo filtrace vzorků [72]. Volba separační techniky pro analýzu pesticidů v biologických matricích a vodě závisí na jejich vlastnostech. Těkavé, polotěkavé a tepelně stabilní sloučeniny se stanovují pomocí GC ve spojení s MS [51,62,73-75] nebo s využitím dusíko-fosforového detektoru [76], detektoru elektronového záhytu [61,66,77], atomově emisního detektoru [78] nebo plamenově fotometrického detektoru [51]. V dnešní době je však při analýze pesticidů upřednostňována HPLC, a to z důvodu polaritativy sloučenin, tepelné nestability a špatné těkavosti [52,79]. Detekce může být provedena spektrofotometrickými [55,67,75,76] nebo fluorimetrickými [80] detektory, avšak nejčastější je spojení HPLC-MS [81,82].

2.2 MOF

Organokovové sítě (MOF) jsou skupinou látek obsahujících ionty kovů koordinovaných k organickým ligandům takovým způsobem, kdy kov a ligand vytvoří vícedimenzionální polymerní síť. Dále dochází k tvorbě dutin a porézních materiálů, jejichž velký povrch se využívá k sorpci organických látek. MOF patří mezi významné funkční porézní materiály v oblasti životního prostředí [83,84].

2.2.1 Složení MOF

Kovové ionty, které se používají pro přípravu MOF, obecně zahrnují ionty mědi, hořčíku, kadmia, zinku, kobaltu, gallia, železa, hliníku, titanu a zirkonia. Na základě koordinačního počtu kovových iontů, které jsou zapojeny do středu, mohou MOF vytvářet různé geometrické koordinační struktury (lineární, ve tvaru T nebo Y, planární čtvercové, kubické, pyramidové, trigonální bi-pyramidové, čtyřboké a osmistěny). MOF se také využívají jako organické linkery, které zahrnují aminy, sulfonáty, fosfáty a karboxyláty. Patří sem kyselina glutarová, 1,4-benzendikarboxylová (BDC), 4'-bifenyldikarboxylová (BPDC), 4,5-imidazol dikarboxylová (H3Imdc) a 1,3,5-benzen trikarboxylová (BTC). Dále 4,4'-bipyridin, imidazol, pyrazin, triazol a 1,4-bis (4'-pyrazolyl) benzen [85].

2.2.2 Syntéza MOF

Při syntéze MOF se primárně využívají dvě metody: hydrotermální metoda (vodné prostředí) a solvotermální metoda (organické prostředí), kde chemické reakce probíhají za zvýšené teploty (obvykle nižší než 250 °C). Hlavními reakčními rozpouštědly jsou voda, methanol, ethanol, N,N-dimethylformamid (DMF) případně jejich směsný roztok. Poté se kovový iont a ligand přidají k rozpouštědлу a zahřívají v teflonovém autoklávu. Organický ligand a anorganická sůl se za vysoké teploty a tlaku rozpustí. Funkční skupiny a koordinační vlastnosti organických ligandů lze flexibilně sestavit v závislosti na použití kovových iontů [86].

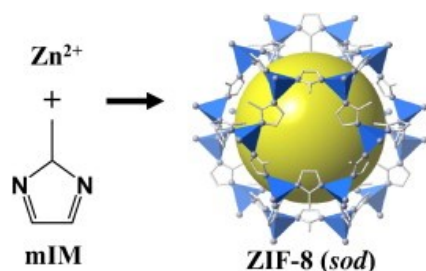
2.2.3 Klasifikace MOF

Mezi nejznámější kategorie MOF patří řada MIL (Material of Institut Lavoisier), která byla syntetizována prostřednictvím lanthanoidů nebo přechodných kovů a kyseliny trimesové nebo tereftalové jako organického ligandu. Patří sem MIL - 53, MIL - 100 a MIL - 101. Mezi další varianty patří Cu - BTC (také známé jako HKUST - 1), kde ionty mědi působí

jako anorganické ligandy. Významnou sérií je i UiO, která byla syntetizována chemickou reakcí mezi kovovým zirkoniem a organickými ligandy, jako jsou UiO-66 a UiO-67 [87-90].

ZIF-8

ZIF-8 (obrázek 42) patří mezi zeolitickou imidazolátovou skupinu (ZIF), což jsou porézní hybridní materiály s analogickými strukturami zeolitů, které jsou formovány pomocí čtyř spojených sítí, přičemž ionty kovů, jako je Zn^{2+} nebo Co^{2+} , jsou spojeny prostřednictvím atomů dusíku v ditopických imidazolátových aniontech [91,92]. ZIF je syntetizována prostřednictvím kovových iontů a imidazolových linkerů, jako jsou ZIF-10, ZIF-68 a ZIF-69. ZIF-8 lze ve vysoké čistotě připravit konvenční solvotermální metodou v organických rozpouštědlech jako je methanol či dimethylformamid. Mezi další varianty patří sonochemická (za pomoci ultrazvuku), mikrovlnně asistovaná, mikrofluidní a mechanochemická metoda a suchý gel [91].



Obrázek 42: Krystalická struktura ZIF-8 [91].

2.3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.3.1 Neonikotinoidy ve vodách

Přístroje a zařízení

Neonikotinoidy ve vodách byly analyzovány na kapalinovém chromatografu AGILENT 1100, který obsahoval kvartérní čerpadlo mobilní fáze, termostat kolon, autosampler, degaser a spektrofotometrický detektor s diodovým polem.

Použité chemikálie

- acetamiprid, thiakloprid, thiamethoxam, klothianidin, imidakloprid (vše $\geq 98\%$), 2-methylimidazol, hexahydrát dusičnanu zinečnatého, *n*-butylamin, kyselina citrónová (vše $\geq 99\%$, vše Sigma-Aldrich)
- methanol, acetonitril (pro HPLC „gradient grade“, VWR International Eurolab, Barcelona, Španělsko)
- deionizovaná voda upravená přes čisticí zařízení Crystal B30 EDI Adrona (Riga, Lotyšsko)
- vodná disperze nanočástic zlata (AuNP) stabilizovaná citrátem sodným (průměrná velikost částic 20 nm, Alfa Aesar, Lancashire, UK)
- SPE propylenové patronky (vnitřní objem 1 ml) a frity (1/16", 20 μm) (Análisis Vínicos, Tomelloso, Španělsko)

Pracovní postup

- **Standardy**

Pro analýzu vod byly připraveny jednotlivé standardní roztoky neonikotinoidů o koncentraci 1 g/l v methanolu, které byly skladovány při teplotě 4 °C až do vlastní analýzy. Pracovní standardní směsi byly připraveny každý den ředěním z těchto zásobních roztoků.

- **Vzorky**

Odběr vzorků vody byl proveden ve Valencii (39° 30' 01,8" N 0° 28' 11,0" Z), kde bylo odebráno přibližně 250 ml vzorku do lahve z tmavého skla, které se následně uskladnilo při teplotě 4 °C až do vlastní analýzy. Před SPE procedurou byla iontová síla upravena pomocí 0,25% (m/m) NaCl a v případě potřeby bylo nastaveno pH na hodnotu 6,0. Prekoncentrační faktor (PF), vypočítaný jako poměr objemu vzorku (15 ml) dělený objemem eluentu (0,25 ml), byl 60.

- **Syntéza (NH₂(C₄)-ZIF-8)**

K získání nanokrystalů ZIF-8 (bez modulátoru) byly potřeba dva methanolvé roztoky. Roztok (A) složený ze Zn(NO₃)₂ · 6H₂O (c = 50 mol/l) a roztok (B) složený z 2-methylimidazolu (c = 395 mol/l). Roztok B byl za stálého míchání přidán do roztoku A a následně se nechal stát při laboratorní teplotě po dobu 24 hodin. Bílá disperze ZIF-8, byla oddělena centrifugací při 6000 otáčkách za minutu po dobu 10 minut. Výsledná pevná látka byla třikrát promyta methanolem a sušena přes noc při teplotě 40 °C.

- **Příprava sorbentu AuNP@NH₂(C₄)-ZIF-8**

Sorbent byl připraven pomocí 250 mg NH₂(C₄)-ZIF-8 a 10 ml komerční disperze AuNP. Směs se během stálého míchání na magnetické míchačce nechala reagovat 10 minut. Důkazem úspěšné reakce byla růžová barva AuNP s amino-modifikovaným materiálem. Následně byl sorbent zfiltrován a třikrát promyt citrátovým pufrem (c = 20 mmol/l; pH 6,0), z důvodu eliminace nezreagovaných AuNP. Celý proces byl opakován až do nasycení materiálu MOF. Nakonec byl výsledný materiál promyt methanolem a sušen přes noc při teplotě 50 °C.

- **SPE protokol**

Do prázdné propylenové patrony o objemu 1 ml bylo vloženo 20 mg sušeného AuNP@NH₂(C₄)-ZIF-8. Z důvodu minimalizace ztrát sorbentu proběhlo vložení mezi tři frity (jedna horní a dvě spodní frity). Dále byla provedena předběžná úprava pevné fáze pomocí methanolu a vody. Následně byl přes extrakční patronu prosát určitý objem standardního roztoku nebo vzorku. Poté byl proveden promývací krok vodou (1 ml). Zadržené rozpuštěné látky byly dvakrát eluovány směsí methanolu a vody (0,25 ml; 60:40, v/v). Takto optimalizovaný off-line SPE postup dosáhl 60násobného zakoncentrování analytů. Patrony SPE byly regenerovány pomocí 1 ml elučního rozpouštědla, 1 ml methanolu a 1 ml vody. Všechny frakce z SPE byly před HPLC-DAD analýzou zfiltrovány pomocí nylonového filtru (0,22 μm).

Podmínky měření

Pesticidy ve vodách byly analyzovány na koloně Kinetex EVO C18 (250 x 4,6 mm, velikost částic 5 μm, Phenomenex). Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitril:voda (26:74, v:v) při průtoku 1 ml/min. Dávkovaný objem byl 20 μl a detekční vlnové délky byly nastaveny na 244 nm (pro thiamethoxam, acetamiprid a thiaklopid) a 270 nm (pro klotianidin a imidaklopid). Všechny tyto podmínky poskytly dostatečné rozlišení v separačním čase 12 minut.

2.3.2 Pesticidy v medu

Přístroje a zařízení

Pro analýzu pesticidů v medu a medovinách byl použit kapalinový chromatograf složený z čerpadla mobilní fáze LC-20AD, degaseru DGU-3014, spektrofotometrického detektoru SPD-20A (vše Shimadzu, Kyoto, Japonsko), dávkovacího zařízení s vnější smyčkou 7725i (Rheodyne, USA) a termostatu kolon LCO 102 single (Ecom, Praha). Optimalizace separace pesticidů v medu byla provedena na rozdílných chromatografických kolonách s chemicky vázanou oktadecylsilikagelovou fází, které se lišily zrnitostí a typem částic. Dále se použily kolony plněné povrchově porézními částicemi Ascentis Express C18 (délka 150 mm, průměr 3 mm, zrnitost 2,7 μm), Kinetex C18 (150 mm \times 3 mm \times 2,6 μm), aqua kolona Zorbax C18 (150 mm \times 3 mm, \times 3,5 μm) a kolona složená ze střídajících se polymerních a silikagelových vrstev YMC C18 (150 mm \times 3 mm \times 3 μm).

Použité chemikálie

- mravenčan amonný ($\geq 99\%$), T-fluvalinát ($\geq 95\%$), karbendazim, acetamidrid, thiakloprid, epoxykonazol, metkonazol, prochloraz, deltamethrin a síran hořečnatý (vše $\geq 98\%$, vše Sigma-Aldrich)
- methanol, acetonitril a chlorid sodný pro HPLC „gradient grade“
- kyselina mravenčí, ($\geq 98\%$, PENTA, Česká republika)
- deionizovaná voda upravená přes čisticí zařízení Mili-Q (Merck Millipore, Německo)

Vzorky

Seznam analyzovaných vzorků medů a medovin je uveden v tabulkách 13 a 18.

Tabulka 15: Vzorky medů.

Vzorek	Název medu	Místo původu
1	Med květový	země EU a mimo EU
2	Med květový Medokomerc	Čestín, ČR
3	Med luční	Doubřavice, ČR
4	Med květový	Itálie
5	Med lesní	Nové Město nad Metují, ČR
6	Med luční	Nové Město nad Metují, ČR
7	Med luční	Zaječice, ČR
8	Med květový	Jízní Čechy
9	Med květový	Pardubice, ČR
10	Med smíšený	Dlouhopolsko, ČR

Vzorek	Název medu	Místo původu
11	Biomed medovicový	země EU a mimo EU
12	Med květový výběrový	země EU a mimo EU
13	Med luční	Trutnov, ČR
14	Med pampeliškový	Morava, ČR
15	Med luční	Pardubice, ČR
16	Med luční	Chorvatsko
17	Med luční Medokomerc	Čestín, ČR
18	Med luční	Horka u Chrudimi, ČR
19	Med luční	Jezbořice, ČR
20	Med akátový	Záboří nad Labem, ČR

EU = země Evropské Unie

Tabulka 16: Vzorky medovin od výrobců ze Slovenské a České republiky.

Vzorek	Název medoviny	Místo původu
1	Medvědí objetí	Hlinsko, ČR
2	Medovina Tajemství noci	Hlinsko, ČR
3	Královská medovina	Zábřeh, ČR
4	Zlatá medovina	Hlinsko, ČR
5	Dolská medovina	Máslovice, ČR
6	Staročeská medovina	České Budějovice, ČR
7	Medovina z Podhradí	Mezholezy, ČR
8	Domácí medovina	Orlické podhůří, ČR
9	Karpatská medovina	Zábřeh, ČR
10	Staroslovanská medovina	Dolná Krupá, SR
11	Medové víno	Domažlice, ČR
12	Bio medovina	Havlíčkův Brod, ČR

Pracovní postup

- **Standardy**

Pro analýzu medů a medovin byly připraveny standardní roztoky fenolických látek v methanolu o koncentraci 1 g/l.

- **Vzorky**

Pro extrakci QuEChERS bylo naváženo 10 g medu (10 ml medoviny), které byly převedeny do centrifugačních zkumavek o objemu 50 ml. K tomuto množství bylo přidáno 10 ml acetonitrilu, 4 g síranu hořečnatého a 1 g chloridu sodného. Následovala minuta třepání a pět minut centrifugace (5000 rpm). Následně byl odebrán 1 ml z vrchní organické vrstvy a převeden do 2 ml SPE patronek, které obsahovaly 150 mg síranu hořečnatého a 25 mg primárního-sekundárního aminu. Následně byla celá směs minutu třepána a minutu centrifugována (10000 rpm) a přečištěna pomocí stříkačkového filtru (PTFE 0,45 μm).

Podmínky měření

Separace pesticidů v medu a medovinách proběhla na koloně YMC C18 (150 mm x 3 mm). Mrtvý objem ($t_M = 1,05$ min) byl změřen pomocí thiomočoviny při izokratické eluci (acetonitril:voda, 10:90). Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,7 ml/min, teplota kolony byla 30 °C a dávkované množství 2 μ l. Mobilní fáze byla složena z acetonitrilu (B) a redestilované vody (A) za použití gradientové eluce 20-95 % acetonitrilu za 8 minut. Pesticidy byly měřeny při vlnové délce 220 nm.

2.3.3 Fenhexamid v ovoci

Přístroje a zařízení

Pro stanovení fenhexamidu v oplachu ovoce byl použit kapalinový chromatograf složený z autosampleru SIL 20ACXR, binárního gradientového čerpadla LC 20ADXR, odplyňovací jednotky DGU 20, detektoru SPD M30A DAD (vše Shimadzu Kyoto, Japonsko) a termostatu kolon (Ecom, Praha, Česká republika).

Použité chemikálie

- fenhexamid, kyselina boritá (≥ 98 %, Sigma-Aldrich)
- methanol pro HPLC „gradient grade“
- kyselina octová ($\geq 99,8\%$) a kyselina mravenčí (≥ 98 %, vše PENTA, Česká republika)
- deionizovaná voda upravená přes čisticí zařízení Mili-Q (Merck Millipore, Německo)
- kyselina fosforečná (≥ 85 %, Lach-ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika)
- hydroxid sodný (p.a.)

Vzorky

Vzorky ovoce (borůvky, jahody, červené hroznové víno a bílé hroznové víno) byly zakoupeny v místních obchodních sítích.

Pracovní postup

• Standardy

Vzhledem k nízké rozpustnosti fenhexamidu (FNX) ve vodě (100 g/l při 20 °C), byl připraven standardní roztok v čistém methanolu (rozpustnost FNX v methanolu při 20 °C je 100 mg/l).

- **Vzorky**

Pro stanovení fenhexamidu byly vybrány čtyři různé vzorky ovoce zakoupené v místních obchodních sítích. Vzorky byly připraveny pro srovnání dvěma různými způsoby. Během prvního způsobu bylo ovoce (25 g) po dobu 15 minut mixováno tyčovým mixérem a následně bylo k 10 g této směsi přidáno 66 μ l 5,0 mmol/l fenhexamidu. Poté byl vzorek zředěn v 50 ml odměrné baňce pomocí 0,1 mol/l Britton–Robinsonova pufru (BRB, pH 4) obsahujícího 10 % (v/v) methanolu. Vzorek byl ponechán 30 minut v ultrazvukové lázni a zfiltrován přes skládaný filtrační papír. Pro analýzu bylo odebráno 10 ml takto získaného filtrátu. Druhý způsob probíhal stejně pouze bez využití mixování. Před chromatografickou analýzou byl roztok filtrován přes polytetrafluorethylenový (PTFE) filtr (velikost pórů 0,22 μ m).

Podmínky měření

Pro analýzu fenhexamidu byla použita kolona Ascentis® Express C18 (150 \times 3,0 mm, velikost částic 2,7 μ m). Separace probíhala při teplotě 30 °C. Jako mobilní fáze byla použita 0,1% kyselina mravenčí ve vodě (A) a methanol (B) s průtokem 0,5 ml/min a využitím gradientové eluce od 60 % do 100 % methanolu za 10 minut. Dávkovaný objem byl 2 μ l a vlnová délka 287 nm.

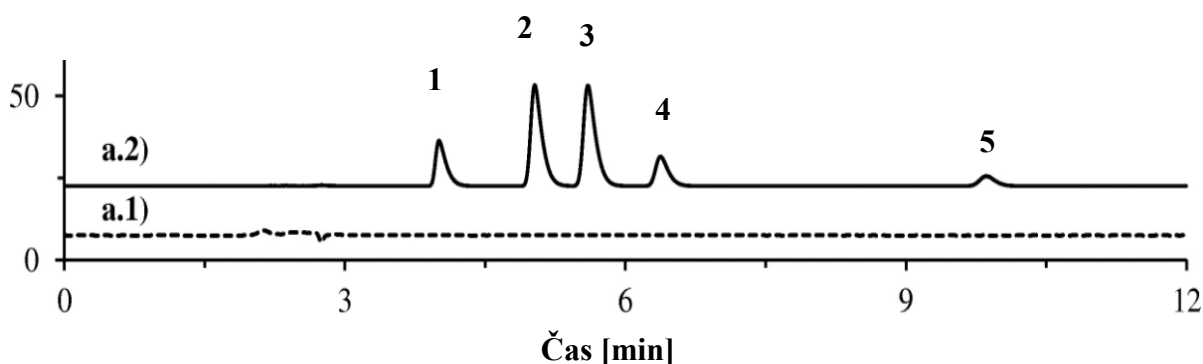
2.4 VÝSLEDKY A DISKUSE

2.4.1 Neonikotinoidy ve vodách

Optimalizace HPLC

Při optimalizaci separace bylo využito standardů monitorovaných pesticidů. Dále bylo optimalizováno složení a průtok mobilní fáze, kde nejlepších výsledků bylo dosaženo při izokratické eluci 26 % ACN ve vodě při průtoku 1 ml/min. Pro detekci thiamethoxamu, acetamipridu a thiaklopridu byla zvolena optimální vlnová délka 244 nm a pro klothianidin a imidakloprid 270 nm (obrázek 45).

Absorbance při 270 nm



Obrázek 43: HPLC-DAD chromatogram neonikotinoidů při 270 nm ve vodě, kde a.1) představuje neobohacený vzorek a a.2) obohacený. Podmínky HPLC separace: mobilní fáze ACN:voda (26:74, v:v); průtok, 1 ml/min; dávkovaný objem 20 μ l, UV detekce při 270 nm. Identifikace píků: 1) thiamethoxam; 2) klothianidin; 3) imidakloprid; 4) acetamiprid; 5) thiakloprid.

Kvantifikace pesticidů

Monitorované pesticidy byly identifikovány na základě shody retenčních časů se standardy. Dále byly kvantifikovány na základě kalibračních závislostí. Koncentrace kalibračních závislostí pro pesticidy ve vodách byla v rozmezí 1-5000 μ g/l. V tabulce 17 je uvedena mez detekce, směrnice, úsek, přesnost a další parametry. Linearita byla v celém koncentračním rozsahu 1-5000 μ g/l větší než 0,999 u všech pěti monitorovaných pesticidů ve vodách. Dále byla zkoumána přesnost a reprodukovatelnost vyvinutého kompozitu jako SPE fáze v kombinaci s metodou HPLC. Výsledky ukazují, že hodnoty relativní směrodatné odchylky (RSD) byly nižší než 10 %, z čehož vyplývá dobrá reprodukovatelnost během použití

a přípravy kompozitu. Hodnoty LOD pesticidů byly v rozmezí 0,019 až 0,041 µg/l. Dále byla zkoumána návratnost, která je znázorněna v tabulce 18.

Tabulka 17: Meze detekce, směrnice, úsek, interval spolehlivosti a přesnost.

Standardy	Směrnice	Úsek	R ²	Přesnost, RSD (n = 3)			LOD (µg/l)
				Intra denní	Inter denní	Dávkování	
Thiamethoxam	0,091 ± 0,001	- 0,064 ± 0,002	0,9999	0,2	5,6	6,2	0,03
Klothianidin	0,136 ± 0,003	0,053 ± 0,003	0,9998	3,1	4,4	7,4	0,03
Imidakloprid	0,14 ± 0,02	- 0,009 ± 0,001	0,9998	2,8	3,8	5,2	0,02
Acetamiprid	0,16 ± 0,01	- 0,070 ± 0,002	0,9999	0,2	6,8	8,2	0,02
Thiakloprid	0,135 ± 0,004	- 0,091 ± 0,001	0,9999	2,8	9,6	9,2	0,04

Tabulka 18: Hodnoty návratnosti pro různé koncentrační hladiny studovaných neonicotinoidů ve vzorcích vod (n = 3).

Standard	Koncentrace (spike) (µg/l)	Návratnost (%)
Thiamethoxam	5	107
	50	82,4
Klothianidin	5	105
	50	97
Imidakloprid	5	107
	50	97
Acetamiprid	5	108
	50	93,2
Thiakloprid	5	107
	50	83

Účinnost ZIF-8 pro SPE extrakci

- **Výběr materiálu**

Volba MOF materiálu je klíčovým aspektem z hlediska retenční účinnosti, selektivity a provedení experimentu. Konkrétně byl vybrán ZIF-8, který vykazuje vysokou tepelnou a chemickou stabilitu a jeho syntéza není komplikovaná. Kvůli eliminaci dalších kroků, které jsou nezbytné při postsyntetické funkcionalizaci MOF byla do ZIF-8 zavedena aminoskupina, kde byl jako modulátor vybrán butylamin (NH₂(C₄)), jehož výhodou je kontrola velikosti a flexibility retenčních vlastností MOF. Dále byla stabilita celého MOF podpořena využitím nanočástic zlata (AuNP), jejichž hlavními výhodami jsou vysoký poměr povrchu vzhledem

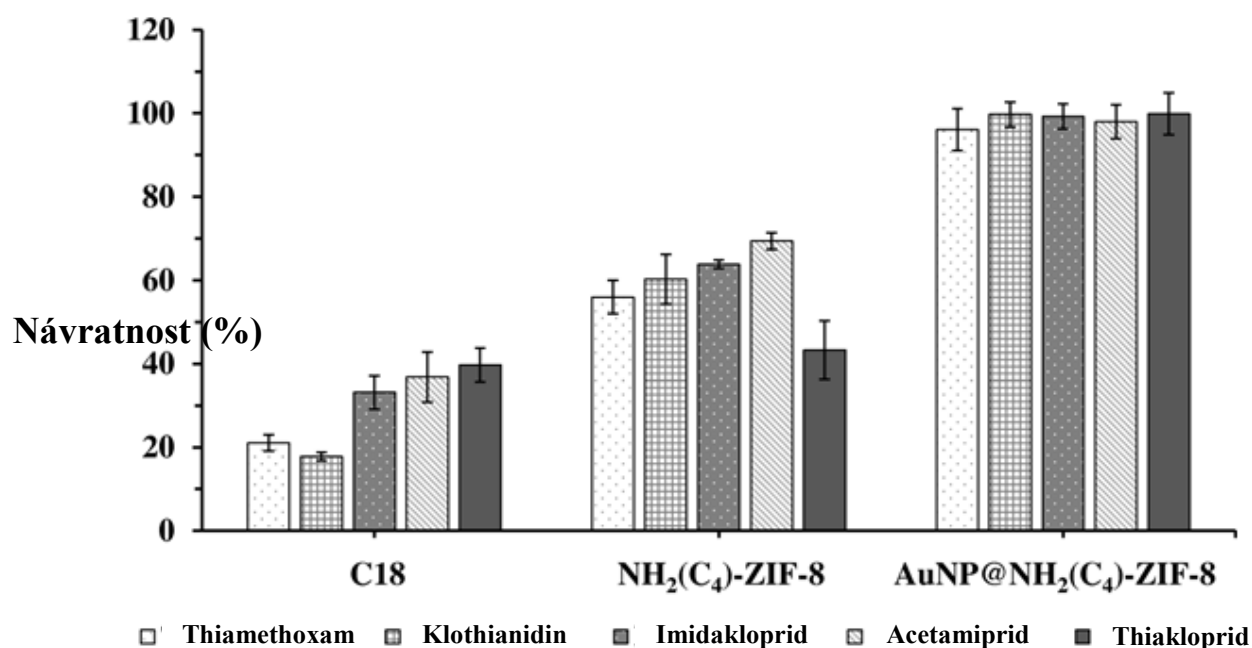
k objemu a optické, elektronické a mechanické vlastnosti související s velikostí či tvarem. Kromě toho AuNP vykazují lepší vlastnosti pro zachycení organických sloučenin obsahujících amino, kyano nebo thiolové skupiny ve své struktuře. Výsledným materiálem byl AuNP@NH₂(C₄)-ZIF-8.

SPE

Nejprve byla testována účinnost SPE extrakce s využitím AuNP jako sorbentu pro neonicotinoidy, kde jako SPE fáze bylo použito 20 mg kompozitu a jako testovací směs vodný roztok obsahující 250 µg/l každého analytu. V rámci optimalizace SPE extrakce bylo dále testováno několik klíčových parametrů, například iontová síla a pH plnicího roztoku, kdy nejlepší výsledků bylo dosaženo při zředění vzorku na pH 6 a po přidavku 0,25% NaCl (m/m). Dále bylo optimalizováno složení a objem elučního rozpouštědla, kterým bylo 500 µl směsi MeOH:H₂O (60:40, v:v). Objem vzorku vody byl 15 ml.

Maximální adsorpční kapacita kompozitu v SPE za vybraných podmínek byla stanovena na 5,4 µg/mg sorbentu s výtěžností téměř 80 %. Tato hodnota byla vyšší než hodnoty uvedené v literatuře pro jiné MOF, které používají tento typ sloučenin. Dále bylo testováno opakované použití sorbentů prostřednictvím promytí extrakční patron methanolem (2 ml) a vodou (1 ml) mezi jednotlivými experimenty, což je klíčový aspekt z hlediska ekonomiky a životního prostředí. Výsledky prokázaly, že účinnost extrakce se významně nezměnila ani po 10 použitích, což naznačuje dobrou znovupoužitelnost sorbentu s přihlédnutím k tomu, že na jednu patronku je potřeba pouze 20 mg.

Pro ověření extrakční účinnosti AuNP@NH₂(C₄)-ZIF-8 pro neonicotinoidy byla provedena srovnávací studie s jiným komerčním sorbentem (fáze C18) a také s nemodifikovaným MOF (s použitím stejného množství sorbentu, 20 mg) za stejných extrakčních podmínek. Vzhledem k hydrofobicitě materiálu byla pozorována (obrázek 46) nízká návratnost u neonicotinoidů (<40 %). V případě MOF byla extrakční účinnost vzhledem k C18 lepší, což mohlo být způsobeno několika interakcemi, jako jsou (1) π-interakce mezi benzenovým kruhem přítomným v ligandech a delokalizovaný π-systém insekticidů a (2) vodíková vazba mezi funkčními skupinami neonicotinoidů a aminoskupinami v ZIF-8. Účinnost extrakce tohoto MOF výrazně vzrostla po implementaci AuNP. Z toho vyplývá klíčová role AuNP v konečném kompozitu. AuNP zavádí další interakce založené na afinitě amino a kyanoskupin, které jsou přítomné v cílových sloučeninách a zvyšují interakci mezi sorbentem a analyty.



Obrázek 44: Účinnost extrakce neonikotinoidů pomocí různých sorbentů (komerční fáze C18; samotný MOF a kompozit).

Podmínky: koncentrace, 250 µg/ml neonikotinoidů v 0,25% (m/m) NaCl při pH 6,0; objem vzorku 15 ml, objem eluentu, 0,25 x 2 ml MeOH:voda (60:40; v:v)

Dále byla testována selektivita kompozitního materiálu prostřednictvím dvou experimentů s různým množstvím (0,25 a 2,5 µg) interferentů, jako jsou pyrethroidy (D-allethrin, tetramethrin) a isothiazolony (4,5-dichlor-2-n-oktyl-4-isothiazol-3-on), které byly přidány do vzorků vody pro extrakci neonikotinoidů. Do roztoků neonikotinoidů byly přidány organofosforečné sloučeniny (profenofos a dialifor), pyridinové (picloram) a fenylnmočovinné herbicidy (monolinuron a diuron) a ionty (NH_4^+ , K^+ a Ca^{2+}). Extrakční účinnost sorbentu při použití roztoků neonikotinoidů obsahujících několik interferujících látek se pohybovala od 93 do 114 %. Z výsledků vyplývá, že výtěžnost cílových analytů nebyla významně ovlivněna přítomností interferujících látek a kompozitní materiál je vhodný pro extrakci neonikotinoidů.

Porovnání s dalšími kompozitními materiály

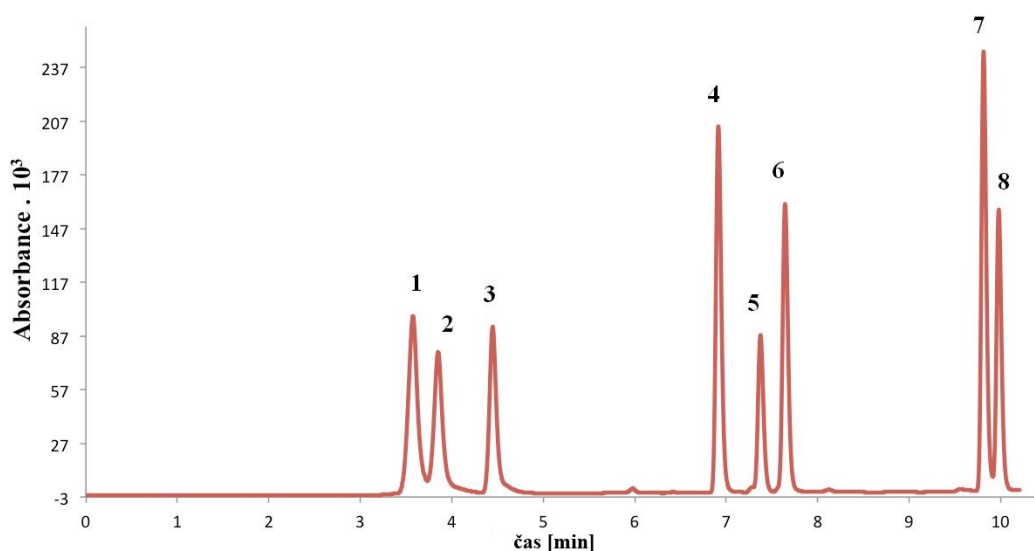
Porovnání účinnosti kompozitního materiálu s ostatními již publikovanými materiály lze najít v příloze (Tabulka 5). Vypočtené hodnoty výtěžnosti byly podobné jako ve většině již uveřejněných publikací s výjimkou několika prací [93-95], kde byla účinnost extrakce nižší než 65 %. Hodnoty LOD ve vodných vzorcích odpovídaly hodnotám uvedeným ve většině dalších publikací [92-98] s výjimkou několika studií, kde byla využita MS detekce [93,96,99,100]. Naopak množství hmotnostního sorbentu (20 mg na extrakční zařízení) bylo výrazně nižší než u komerčních SPE (200–500 mg) [93,96] nebo QuEChERS

(přibližně 5 g) [95,99,100] a srovnatelné se sorbenty d-SPE (20–50 mg) a Oasis HLB (60 mg) [103-106]. Další výhodou syntetizovaného sorbentu je možnost znovupoužití ve srovnání s jednorázovými komerčními patronami. Z ekologického a ekonomického hlediska byly pro eluci těchto vzorků vyžadovány nižší objemy organických rozpouštědel a možnost výroby více patron SPE. Vezmeme-li v úvahu tyto aspekty společně s použitím běžného zařízení HPLC-DAD (dostupného ve většině analytických laboratoří), činí tato metoda zajímavou a atraktivní alternativu ke kontrole neonikotinoidů ve vzorcích vody v životním prostředí.

2.4.2 Pesticidy v medu

Optimalizace HPLC

Před analýzou bylo optimalizováno složení a průtok mobilní fáze, výběr kolon a vlnová délka s využitím standardů vybraných pesticidů. Nejprve byly použity kolony s chemicky vázanou oktadecylsilikagelovou fází, které se odlišovaly zrnitostí a typem částic. Při využití kolon na bázi silikagelu (Supelco-USA, Kinetex C18, Zorbax C18) docházelo ke koeluci. Proto byla zvolena kolona s hybridní stacionární fází YMC C18, kde nebylo pozorováno chvostování píků a bylo dosaženo více než jednotkového rozlišení u všech monitorovaných pesticidů (obrázek 47). Při optimalizaci separace vybraných pesticidů byly použity vlnové délky 220, 240, 245 a 280 nm. Optimální vlnová délka pro detekci všech pesticidů byla 220 nm. Pesticidy eluovaly v následujícím pořadí: karbendazim, acetamiprid, thiaklopid, epoxykonazol, metkonazol, prochloraz, deltamethrin a T-fluvalinát.



Obrázek 45: Optimalizovaná HPLC separace vybraných pesticidů (YMC - Triart C18 kolona, průtok 0,7 ml/min, dávkovaný objem 2 μ l, teplota 30 $^{\circ}$ C, detekce při 220 nm)
1 – Karbedazim, 2 – Acetamiprid, 3 – Thiaklopid, 4 – Epoxykonazol, 5 – Metkonazol, 6 – Prochloraz, 7 – Deltamethrin, 8 – T-fluvalinát.

Optimalizace extrakce

Nejprve byla vybrána vhodná sůl pro QuEChERS extrakci. Byl testován síran hořečnatý s přídavkem chloridu sodného nebo octanu amonného. Vyšší účinnost extrakce byla pozorována v případě přídavku chloridu sodného. Dále byl testován i přídavek dalších sloučenin (kyselina octová a citrát sodný), které nezvýšily účinnost extrakce. Z tohoto důvodu byl ve všech experimentech použit základní jednoduchý postup extrakce, při kterém byla využita směs síranu hořečnatého s chloridem sodným a acetonitril jako rozpouštědlo.

Kvantifikace pesticidů

Monitorované pesticidy byly kvantifikovány pomocí kalibračních závislostí v rozmezí 0,5-20 mg/l (minimálně sedm koncentračních hladin). Každý kalibrační roztok byl proměřen třikrát. Pro regresní diagnostiku byl využit program QC expert 2.5 (Trilobyte), kde pro indikaci vlivných bodů byly použity grafické diagnostické testy (Pregibonův graf, Williamsův graf, L-R graf, Jacknife rezidua a McCulloh-Meterův graf). Testování probíhalo na hladině významnosti 95 % ($\alpha = 0,05$). Vybrané validační parametry kalibračních závislostí jsou uvedeny v tabulce 19. U kalibračních závislostí byla testována významnost absolutního členu (úseku). Jen ve dvou případech (prochloraz a epoxykonazol) byl úsek nevýznamný a přímka procházela nulou (tabulka 19).

Tabulka 19: Směrnice, úsek, interval splehlivosti, meze detekce a meze stanovitelnosti standardů v medu a medovinách.

Standardy	Směrnice	Úsek	R ²	LOD [µg/l]	LOQ [µg/l]
Acetamiprid	1,59 ± 0,02	-1,4 ± 0,78	0,9997	50.5	168
Thiaklopid	11,4 ± 0,57	2,2 ± 1,67	0,9950	71.3	237
Karbendazim	18,5 ± 0,64	-11 ± 5,001	0,9962	96.2	321
Prochloraz	868 ± 21,9	P = 0,2099*	0,9934	74.0	247
T-fluvalinát	521 ± 11,28	17 ± 12,12	0,9990	92.3	308
Metkonazole	11,8 ± 0,07	P = 0.2269*	0,9998	87.0	290
Deltamethrin	996 ± 22	44 ± 14,44	0,9990	56.2	187
Epoxykonazol	18,5 ± 0,48	50 ± 17,94	0,9983	82.8	276

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

Vybrané pesticidy byly analyzovány ve dvaceti vzorcích medu a dvanácti vzorcích medovin pomocí optimalizované extrakční a separační metody. Extrakce byla provedena dvakrát a každý jednotlivý extrakt byl měřen třikrát. Na základě kalibračních křivek byl vypočítán obsah monitorovaných pesticidů v medu (tabulka 20) a v medovinách (tabulka 21). Výsledky ukazují, že nezáleží na tom, zda je med zakoupen v obchodě nebo od včelaře. Množství pesticidů, které se do medu dostávají z prostředí, nelze ovlivnit. Přítomnost jednotlivých pesticidů ve všech vzorcích se opakuje, ačkoliv se jednalo o vzorky z České republiky, Itálie, Chorvatska nebo Slovenska. Vysoká koncentrace pesticidu thiaclopridu a T-fluvalinátu byla zaznamenána v oblasti Náchodska ve vzorcích medu 5 a 7. Thiacloprid byl nalezen v podobných koncentracích i ve Středočeském kraji, Královéhradeckém kraji a Pardubickém kraji. V Pardubickém kraji byla v některých případech (vzorky medu 10, 11 a 13) rovněž zjištěna i přítomnost Prochlorazu. Pesticid T-fluvalinát byl nalezen především v okolí Nového Města nad Metují (vzorky medu 6 a 7). Karbendazim byl zaznamenán pouze v obci Doubravice (Královéhradecký kraj, vzorek medu 5), ačkoliv je od roku 2013 zakázán. Zajímavostí je, že i v bioproduktech byly rovněž nalezeny pesticidy. Produkty označené bioznačkami mají zaručit, že včely nemají možnost opylovat místa ošetřená pesticidy. U vzorků medovin byly nalezeny menší koncentrace pesticidů než u vzorků medu.

Tabulka 20: Koncentrace pesticidů ve vzorcích medu.

č.	Karbendazim [mg/kg]	Acetamiprid [mg/kg]	Thiakloprid [mg/kg]	Prochloraz [mg/kg]	T-fluvalinát [mg/kg]
1	–	–	1,4 ± 0,19	–	–
2	–	2,78 ± 0,03	2,04 ± 0,03	–	–
3	–	–	1,67 ± 0,02	–	–
4	–	0,24 ± 0,02	1,25 ± 0,07	0,20 ± 0,01	–
5	5,9 ± 0,47	–	16,4 ± 0,42	–	–
6	–	0,22 ± 0,91	1,9 ± 0,32	–	0,02 ± 0,01
7	–	–	21,7 ± 0,33	–	76 ± 0,53
8	–	–	1,25 ± 0,07	0,50 ± 0,01	–
9	–	–	1,34 ± 0,05	–	–
10	–	–	–	0,63 ± 0,01	–
11	–	0,41 ± 0,06	0,85 ± 0,07	1,12 ± 0,01	–
12	–	16,9 ± 0,71	0,92 ± 0,08	–	–
13	–	–	1,91 ± 0,06	0,59 ± 0,01	–
14	–	–	–	0,42 ± 0,06	–
15	–	5,32 ± 0,02	–	–	–
16	–	1,3 ± 0,65	1,2 ± 0,84	–	–
17	–	–	0,90 ± 0,04	–	–
18	–	–	–	–	–
19	–	–	0,88 ± 0,03	–	5,46 ± 0,02
20	–	–	2,25 ± 0,04	–	3,22 ± 0,06

Tabulka 21: Koncentrace pesticidů ve vzorcích medovin.

č.	Karbendazim [mg/l]	Acetamiprid [mg/l]	Thiakloprid [mg/l]
1	–	1,64 ± 0,01	–
2	–	2,39 ± 0,07	1,92 ± 0,03
3	–	–	–
4	–	–	–
5	–	–	–
6	–	–	–
7	–	–	–
8	–	–	–
9	–	–	–
10	–	0,67 ± 0,02	–
11	–	8,3 ± 0,51	–
12	0,19 ± 0,02	79,1 ± 0,35	17,8 ± 0,92

2.4.3 Fenhexamid v ovoci

Optimalizace HPLC

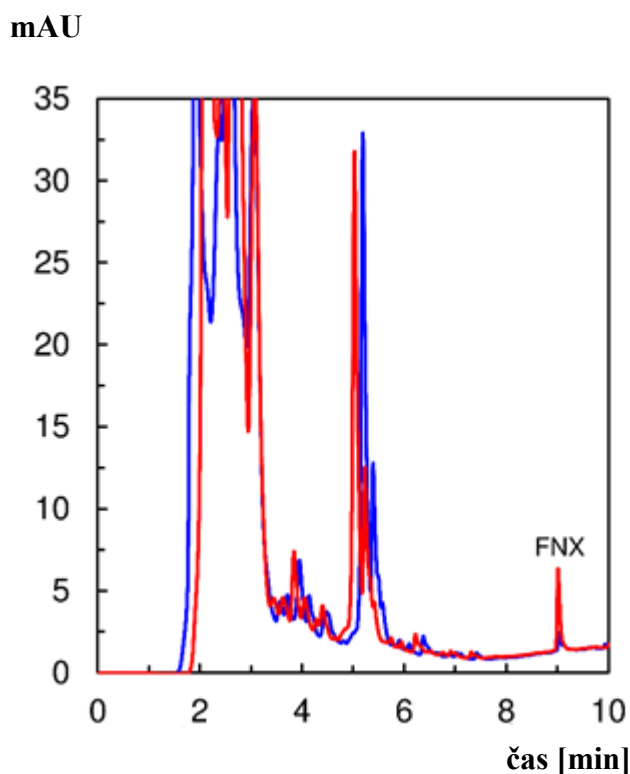
Pomocí standardu fenhexamidu byl optimalizován průtok a složení mobilní fáze, vlnová délka a teplota. Optimální separace fenhexamidu od ostatních interferujících látek bylo dosaženo pomocí gradientové eluce 60-100% MeOH v 0,1% kyselině mravenčí za 10 minut. Zvolená vlnová délka pro detekci fenhexamidu byla 287 nm.

Kvantifikace fenhexamidu v oplachu ovoce

Nejdříve byl optimalizován způsob přípravy vzorku pomocí dvou metod, jejichž hlavním rozdílem bylo využití homogenizačního kroku (viz kapitola 2.3.3.4). Na základě experimentu bylo potvrzeno, že většina reziduí pesticidů je přítomna převážně ve slupkách ovoce a že fenhexamid nedifunduje do ovocné dužiny. Dále bylo prokázáno, že mytí ovoce a zeleniny vodou z vodovodu je pro odstranění fenhexamidu ze slupek neúčinné (43 %). Pomocí detergentů (dichlormethan, isopropanol, acetonitril, toluen a *n*-hexan) bylo odstraněno až 60 % fenhexamidu. Oplach celých bobulí pomocí methanolu je dostatečný a jednoduchý způsob pro odstranění fenhexamidů ze vzorků potravin.

Chromatografické záznamy separace při analýze červených vinných hroznů jsou zobrazeny na obrázku 48. Z uvedeného obrázku lze vidět, že retenční čas fenhexamidu byl 9,02 min. Testované vzorky borůvek a červené vinných hroznů obsahovaly pouze minimální množství fenhexamidu (tabulka 22). Jahody a bílé vinné hrozny tento fungicid neobsahovaly vůbec. Dále byla optimalizována návratnost a matriční efekt prostřednictvím obohacení vzorků

známým množstvím fenhexamidu. Co se týká maximálního povoleného množství reziduí fenhexamidu, lze všechny analyzované vzorky považovat za zdravotně nezávadné.



Obrázek 46: RP-HPLC chromatogram červeného vinných hroznů (modrá linie) obohacený 30 µmol/l FNX (červená linie).

Podmínky: Ascentis® Express C18 kolona (150×3,0 mm, velikost částic 2,7 µm); mobilní fáze složená z 0,1% HCOOH ve vodě (A) a MeOH (B); gradientová eluce od 60-100% B za 10 min; průtok 0.5 ml/min; dávkovaný objem 2 µl; teplota 30 °C; detekce při 287 nm.

Tabulka 22: Analýza obsahu fenhexamidu v komerčně dostupných bobulích a vinných hroznech získaná pomocí RP-HPLC.

Ovoce	RP-HPLC	Maximální limit reziduí (MRL)
	Fenhexamid (mg/kg)	Fenhexamid (mg/kg)
Borůvky	0,6 ± 0,1	5
Borůvky obohacené*	4,8 ± 0,3	5
Jahody	—	5
Jahody obohacené*	17 ± 0,4	18
Hrozo červené	5,4 ± 0,4	5
Hrozo bílé	—	5

Poznámka: *obohacení pomocí 66 µl 5,0 mmol/l FNX, 5 opakování každé analýzy (n = 5) na hladině významnosti 0,05 (95 % interval spolehlivosti).

2.5 ZÁVĚR

Poprvé byla provedena syntéza kompozitního materiálu na bázi $\text{NH}_2(\text{C}_4)\text{-ZIF-8}$ a AuNP a zároveň i jeho využití jako SPE sorbentu pro extrakci neonikotinoidů. Výhoda tohoto hybridního materiálu byla absence jakéhokoliv postfunkcionalizačního kroku při spojení MOF a AuNP a dále možnost rozšíření jeho použití i na další nanostruktury. V kombinaci s dostupnou technikou HPLC-DAD poskytoval vysokou výtěžnost a nízké LOD. Dalšími výhodami tohoto kompozitního materiálu byly malá spotřeba eluentu při předúpravě oproti konvenčním SPE metodám a znovupoužitelnost extrakčních patronek. $\text{AuNP@NH}_2(\text{C}_4)\text{-ZIF-8}$ je pro svou dostupnost a jednoduchost vhodným materiálem ke stanovení neonikotinoidů ve vzorcích vody v životním prostředí.

Cílem výzkumu pesticidů v medu a medovinách byla analýza rizika jejich dopadu na životní prostředí. Ke stanovení vybraných pesticidů bylo využito spojení HPLC separace s extrakcí QuEChERS. Tato metoda byla aplikována celkem na 20 vzorků medů a 12 vzorků medovin získaných od včelařů nebo zakoupených na místních trzích. Bylo prokázáno, že původ vzorků (včelař nebo obchod) neměl na výsledky vliv. Dalším zajímavým faktorem pro srovnání byla země původu. Ačkoliv byly k dispozici vzorky z České republiky, Slovenska, Itálie a Chorvatska jejich obsah pesticidů byl podobný. Dále byly nalezeny pesticidy i v bioproduktech, přestože produkty označené jako bio by žádné pesticidy obsahovat neměly. Obecně je koncentrace pesticidů ve vzorcích medovin nižší než ve vzorcích medu, což je ovlivněno ředěním během výroby medoviny. Dalším zajímavým zjištěním byla přítomnost karbendazimu v některých vzorcích, i když je od roku 2013 zakázán. Pravděpodobně je tento pesticid stále kumulovaný v životním prostředí.

Při stanovení fenhexamidu bylo prokázáno, že se tento pesticid akumuluje převážně ve slupkách ovoce a pouhé mytí vodou je pro jeho odstranění nedostatečné. Do ovocné dužiny se tento pesticid však nedostává. Při mytí vodou z vodovodu dojde k odstranění 43 % fenhexamidu a při mytí komerčně dostupnými detergenty se odstraní 60 % fenhexamidu. Dostatečného odstranění lze tedy dosáhnout použitím organických rozpouštědel, kdy například oplachování celých bobulí pomocí čistého methanolu by bylo považováno za dostatečný a jednoduchý způsob odstranění fenhexamidu ze vzorků potravin. Tato možnost však pro běžného spotřebitele postrádá smysl.

2.6 LITERATURA

- 1) VLČEK, V., POHANKA, M. Enviromentální aspekty užití organofosorových a karbamátových pesticidů schválených k užití v České republice. *Chemické listy*. 2011. 105, 908–912.
- 2) DIXIT, S., SRIVASTAVA, M. P., SHARMA, Y. K. Pesticide-and-Human-Health -A-Rising-Concern-of-the-21st-Century. Handbook of Research on the Adverse Effects of Pesticide Pollution in Aquatic Ecosystems. IGI Global.: 2018. 85-104.
- 3) EGBUNA, C., SAWICKA, B. Natural Remedies for Pest, Disease and Weed Control, Chapter 3 - Pesticides, History, and Classification. První edice. Academic Press: 2020. 29-42. ISBN: 9780128193044.
- 4) KAUR, R., MAVI, G. K., RAGHAV, S., KHAN, I. Pesticides Classification and its Impact on Environment. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2019. 8, 1889-1897.
- 5) KAZDA, J. Chemická ochrana rostlin. Dostupné z: http://etext.czu.cz/php/skripta/obsah.php?titul_key=56.
- 6) SANCHEZ-BAYO, F., GOKA, K. Pesticide Residues and Bees - A Risk Assessment. *Plos One*. 2014. 9, 94482.
- 7) JACTEL, H., VERHEGGEN, F., THIÉRY, D., ESCOBAR-GUTIÉRREZ, A. J., DESNEUX, N., THE NEONICOTINOIDES WORKING GROUP. Alternatives to neonicotinoids. *Environment International*. 2019. 129, 423-429.
- 8) TOMIZAWA, M., LEE, D. L., CASIDA, J. E. Neonicotinoid Insecticides: Molecular Features Conferring Selectivity for Insect versus Mammalian Nicotinic Receptors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000. 48, 6016-6024.
- 9) SANCHÉZ-BAYO, F., HYNNE, R. V. Detection and analysis of neonicotinoids in river waters – Development of a passive sampler for three commonly used insecticides. *Chemosphere*. 2014. 99, 143-151.
- 10) BONMATIN, J. M., GIORIO, C., GIROLAMI, V., GOULSON, D., KREUTZWEISER, D. P., KRUPKE, C., LIESS, M., LONG, E., MARZARO, M., MITCHELL, E. A. D., NOOME, D. A., SIMON-DELISO, N., TAPPARO, A. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environmental Science and Pollution Research*. 2015. 22, 35–67.

- 11) CARRINGTON, D. EU agrees total ban on bee-harming pesticides. *The Guardian*. 2018. Dostupné z: <https://www.theguardian.com/environment/2018/apr/27/eu-agrees-total-ban-on-bee-harming-pesticides>.
- 12) OBEREMOK, V., ALEKSEI, Z., NYADAR, P., LEVCHENKO, N. N. A Brief Review of Most Widely Used Modern Insecticides and Prospects for the Creation of DNA *Insecticides*. *Entomological Review*. 2015. 97, 507-518.
- 13) GUO, L., FANG, W. W., GUO, L. L., YAO, C. F., ZHAO, Y. X., GE, F., DAI, Y. J. Biodegradation of the Neonicotinoid Insecticide Acetamiprid by Actinomycetes *Streptomyces canus* CGMCC 13662 and Characterization of the Novel Nitrile Hydratase Involved. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014. 62, 2790-2796.
- 14) DECOURTYE A, DEVILLERS J. Ecotoxicity of neonicotinoid insecticides to bees. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2019. 67, 5922-5931.
- 15) Commission Implementing Regulation (EU) 2020/23 of 13 January 2020 concerning the non-renewal of the approval of the active substance thiacloprid, in accordance with Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council concerning the placing of plant protection products on the market, and amending the Annex to Commission Implementing Regulation (EU) No 540/2011. Dostupné z: https://eur-lex.europa.eu/eli/reg_impl/2020/23/oj.
- 16) Phytocontrol. Derogation of use of 2 neonicotinoids in France. Dostupné z: <https://www.phytocontrol.com/en/regulatory-watch/derogation-of-use-of-2-neonicotinoids-in-france/>.
- 17) MAIENFISCH, P., ANGST, M., BRANDL, F., FISCHER, W., HOFER, D., KAYSER, H., KOBEL, W., BACHER, A. R., SENN, R., STEINEMANN, A., WIDMER, H. Chemistry and biology of thiamethoxam: a second generation neonicotinoid. *Pest management Science*. 2001. 57, 906-913.
- 18) UNEME, H. Chemistry of Clothianidin and Related Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011. 59, 2932-2937.
- 19) VINOCHKUMAR, B., SHANMUGAPRIYA, R., SANGAMITHRA, S., KUTTALAM, S. Efficacy of clothianidin 50 WDG against termites in sugarcane. *Journal of Sugarcane Research*. 2018, 8, 66-75.
- 20) BURNS, C. J. Pyrethroid epidemiology: a quality-based review. *Critical Reviews in Toxicology Volume*. 2018. 48, 297-311.
- 21) LU, Q., SUN, Y., ARES, I., ANADÓN, A., MARTÍNEZ, M., MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. R., YUAN, Z., WANG, X., MARTÍNEZ, M. A. Deltamethrin

- toxicity: A review of oxidative stress and metabolism. *Environmental Research*. 2019. 170, 260-281.
- 22) TAO, M., ZHANG, G., PAN, J., XIONG, C. Deciphering the groove binding modes of tau-fluvalinate and flumethrin with calf thymus DNA. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2016. 155, 28-37.
- 23) TSIGOURI, A. D., MENKISSOGLU-SPIROUDI, U., THRASYVOULOU, A. Study of tau-fluvalinate persistence in honey. *Pest management Science*. 2001. 57, 467-471.
- 24) MORTON V., STAUB T. A short history of fungicides. APSnet feature articles. Dostupné z: <http://www.apsnet.org>. 2008.
- 25) WANG, S. Y., SHI, X. C., LIU, F. Q., LABORDA, P. Chromatographic Methods for Detection and Quantification of Carbendazim in Food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2020. 68, 11880-11894.
- 26) BERTELSEN, J. R., DE NEERGAARD, E., SMEDEGAARD-PETERSEN, V. Fungicidal effects of azoxystrobin and epoxiconazole on phyllosphere fungi, senescence and yield of winter wheat. *Plant Pathology*. 2001. 50, 190-205.
- 27) LIANG, H., QIU, J., LI, L. LI, W., ZHOU, Z., LIU, F., QIU, L. Stereoselective dissipation of epoxiconazole in grape (*Vitis vinifera* cv. Kyoho) and soil under field conditions. *Chemosphere*. 2012. 87, 982-987.
- 28) HE, R., GUO, D., HUANG, Z., KONG, Y., JI, C., GU, J., ZHANG, Z., DIAO, J., ZHOU, Z., ZHAO, M., FAN, J., ZHANG, W. Systematic investigation of stereochemistry, stereoselective bioactivity, and antifungal mechanism of chiral triazole fungicide metconazole. *Science of The Total Environment*. 2021. 784, 147194.
- 29) ABDELRAHMAN, M. T., QIN, X., LI, D., SENOSY, I. A., MMBY, M., WAN, H., LI, J., HE, S. Pectinase-responsive carriers based on mesoporous silica nanoparticles for improving the translocation and fungicidal activity of prochloraz in rice plants. *Chemical Engineering Journal*. 2021. 404, 126440.
- 30) HASELMAN, J. T., KOSIAN, P. A., KORTE, J. J., OLMSTEAD, A. W., SIGMUND, J. Degitza Effects of multiple life stage exposure to the fungicide prochloraz in *Xenopus laevis*: Manifestations of antiandrogenic and other modes of toxicity. *Aquatic Toxicology*. 2018. 199, 240-251.
- 31) DEBIEU, D., BACH, J., HUGON, M., MALOSSE, C., LEROUX, P. The hydroxyanilide fenhexamid, a new sterol biosynthesis inhibitor fungicide efficient against the plant pathogenic fungus *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Pest Management Science*. 2001. 57, 1060-1067.

- 32) SEIBER, J. N. Pesticide Residues and Food Safety: a Harvest of Viewpoints. American Chemical Society Symposium: Washington 1991. 125.
- 33) DUROVIC, R., DORDEVIC, T. Modern Extraction Techniques for Pesticide Residues Determination in Plant and Soil Samples. In STOYTICHEVA, M. (ed.). Agricultural and Biological Sciences. Srbsko: Institute of Pesticides and Environmental Protection, Belgrade: 2011. 221–233
- 34) RIAL-OTERO, R., GASPAR, E. M., MOURA, I., CAPELO, J. L. Chromatographic-based methods for pesticide determination in honey: An overview. *Talanta*. 2007. 71, 503–514.
- 35) QuEChERS. In: Sigmaaldrich. 2013. vyd. [cit. 2021-06-06]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/supelco/55228u?lang=en®ion=CZ>.
- 36) LABICOM. Superkritická fluidní extrakce. 2016 [cit 2021-06-06]. Dostupné z: <http://www.labicom.cz/sfe-43/>.
- 37) Vyhláška ministerstva zdravotnictví ČR č. 298/1997 Sb., kterou se stanoví chemické požadavky na zdravotní nezávadnost jednotlivých druhů potravin a potravinových surovin, podmínky jejich použití, jejich označování na obalech, požadavky na čistotu a identitu přídatných látek a potravních doplňků a mikrobiologické požadavky na potravní doplňky a látky přídatné.
- 38) SAMSIDAR, A., SHAARANI, S. M., SIDDIQUEE, S. A review of extraction, analytical and advanced methods for determination of pesticides in environment and foodstuffs. *Trends in Food Science & Technology*. 2018. 71, 188-201.
- 39) AYDINALP C., PORCA M. M. The effects of pesticides in water resources. *Journal of Central European Agriculture*. 2004. 5, 5–12.
- 40) ZUBROD J. P., BUNDSCHUH M., ARTS, G., BRÜHL C. A., IMFELD, G., KNÄBEL, A., PAYRAUDEAU S., RASMUSSEN J. J., ROHR, J., SCHARMULLER, A., SMALLING, K., STEHLE, S., SCHULZ, R., SCHÄFER, R. B. Fungicides: An Overlooked Pesticide Class? *Environmental Science and Technology*. 2019. 53, 3347–3365.
- 41) NATIONAL RESEARCH COUNCIL, BOARD ON AGRICULTURE, COMMITTEE ON LONG-RANGE SOIL AND WATER CONSERVATION POLICY. Soil and Water Quality: An Agenda for Agriculture. National Academies Press; Cambridge, MA, USA: 1993. ISBN: 978-0-309-04933-7.
- 42) SYAFRUDIN, M., KRISTANTI, R. A., YUNIARTO, A., HADIBARATA, T., RHEE, J., AL-ONAZI, W. A., ALGARNI, T. S., ALMARRI, A. H., AL-MOHAIMEED, A.

- M. Pesticides in Drinking Water—A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2021. 18, 468.
- 43) REETZ, J., ZUEHLKE, S., SPITELLER, M., WALLNER, K. Neonicotinoid insecticides translocated in guttated droplets of seed-treated maize and wheat: a threat to honeybees? *Apidologie*. 2011. 42, 596–606.
- 44) IWASA, T., MOTOYAMA, N., AMBROSE, J. T., ROE, R. M. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Protection*. 2004. 23, 371–378.
- 45) PINHO, G. P., NEVES, A. A., QUEIROZ, M., SILVERIO, F. O. Optimization of the liquid – liquid extraction method and low temperature purification (LLE-LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography. *Food Control*. 2010. 21, 1307–1311.
- 46) GARCIA-CHAO, M., AGRUNA, M. J., CALVETE, G. F., SAKKAS, V., LLOMPART, M., DAGNAC, T. Validation of an off line solid phase extraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of systemic insecticide residues in honey and pollen samples collected in apiaries from NW Spain. *Analytica Chimica Acta*. 2010. 672, 107–113.
- 47) BLASCO, C., VASQUEZ-ROIG, P., ONGHENA, M., MASIA, A., PICÓ, Y. Analysis of insecticides in honey by liquid chromatography–ion trap-mass spectrometry: Comparison of different extraction procedures. *Journal of Chromatography A*. 2011. 1218, 4892–4901.
- 48) GILART, N., BORRULL, F., FONTANALS, N., MARCÉ, R. M. Selective materials for solid-phase extraction in environmental analysis. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*. 2014, 1, 8-18.
- 49) ANTHEMIDIS, A. N., IOANNOU, K. I. G. Recent developments in homogeneous and dispersive liquid-liquid extraction for inorganic elements determination: a review. *Talanta*. 2009. 80, 413–421.
- 50) PENA-PEREIRA, F., LAVILLA, I., BENDICHO, C. Miniaturized preconcentration methods based on liquid-liquid extraction and their application in inorganic ultratrace analysis and speciation: a review. *Spectrochimica Acta Part B*. 2009. 64, 1–15.
- 51) AMENDOLA, G., PELOSI, P., DOMMARCO, R. Solid-phase extraction for multi-residue analysis of pesticides in honey. *Journal of Environmental Science and Health*. 2011. 46, 24–34.

- 52) KUJAWSKI, M. W., BARGANSKA, A., MARCINIAK, K., MIEDZIANOWSKA, E., KUJAWSKI, J. K., SLEBIODA, M., NAMIESNIK, J. Determining pesticide contamination in honey by LC-ESI-MS/MS-Comparison of pesticide recoveries of two liquid-liquid extraction based approaches. *LWT-Food and Science Technology*. 2014. 56, 517–523.
- 53) PIRARD, C., WIDART, J., NGUYEN, B. K., DELEUZE, C., HEUDT, L., HAUBRUGE, E., PAUW, E., FOCANT, J. F. Development and validation of a multi-residue method for pesticide determination in honey using on-column liquid-liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2007. 1152, 116–123.
- 54) TETTE, P. A. S., GUIDI, L. R., GLÓRIA, M. B. A., FERNANDES, C. Pesticides in honey: A review on chromatographic analytical methods. *Talanta*. 2016. 149, 124–141.
- 55) ANASTASSIADES, M., MASTOVSKA, K., LEHOTAY, S. J. Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides. *Journal of Chromatography A*. 2003. 1015, 163–184.
- 56) LI, M., ZHANG, J. H., LI, Y. B., PENG, B., ZHOU, W. F., GAO, H. X. Ionic liquid-linked dual magnetic microextraction: a novel and facile procedure for the determination of pyrethroids in honey samples. *Talanta*. 2013. 107, 81–87.
- 57) ZHANG, Y., HUANG, X. J., YUAN, D. X. Determination of benzimidazole anthelmintics in milk and honey by monolithic fiber-based solid-phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography-diode array detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2015. 407, 557–567.
- 58) BALTUSSEN, E., CRAMERS, C. A., SANDRA, P. J. F. Sorptive sample preparation—a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2002. 373, 3–22.
- 59) YU, C. H., HU, B. Sol-gel polydimethylsiloxane/poly(vinylalcohol)-coated stir bar sorptive extraction of organophosphorus pesticides in honey and their determination by large volume injection GC. *Journal of Separation Science*. 2009. 32, 147–153.
- 60) TSIROPOULOS, N. G., AMVRAZI, E. G. Determination of pesticide residues in honey by single-drop microextraction and gas chromatography. *Journal of AOAC International*. 2011. 94, 634–644.
- 61) DU, Z., LIU, M., LI, G. K. Novel magnetic SPE method based on carbon nanotubes filled with cobalt ferrite for the analysis of organochlorine pesticides in honey and tea. *Journal of Separation Science*. 2013. 36, 3387–3394.

- 62) ZHOU, Q., WANG, W. AND XIAO J. Preconcentration and determination of nicosulfuron, thifensulfuron-methyl and metsulfuron-methyl in water samples using carbon nanotubes packed cartridge in combination with high performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*. 2006. 559, 200.
- 63) ZHAO, T., HOU, C., ZHANG, H., ZHU, R., SHE, S., WANG, J., LI, T., LIU, Z., WEI, B. Stretchable and High-Performance Supercapacitors with Crumpled Graphene Papers. *Scientific Reports*. 2014. 4, 5619.
- 64) NAIR, A. S., PRADEEP, T. Extraction of Chlorpyrifos and Malathion from Water by Metal Nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2007, 7, 1871.
- 65) VÍLCHEZ, J. L., PRIETO, A., ARAUJO, L., NAVALÓN, A. Determination of fipronil by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2001, 919, 215-221.
- 66) JIMENEZ, J. J., BERNAL, J. L, DEL NOZAL, M. J., MARTÍN, M. T., MAYO, R. Sample preparation methods to analyze fipronil in honey by gas chromatography with electron-capture and Mmass spectrometric detection *Journal of Chromatography A*. 2008. 1187, 40-45.
- 67) CHEN, Y., LI, C., TU, J. C., AN, L. N. Synthesis of short multi-walled carbon nanotubes by molecular self-assembly. *New Carbon Materials*. 2012. 27, 416-420.
- 68) ABDELBASIR, S. M. SHALAN, A. E. An overview of nanomaterials for industrial wastewater treatment. *Korean Journal of Chemical Engineering*. 2019. 36, 1209.
- 69) KUMAR, P., VEJERANO, E., KHAN, A., LISAK, G., AHN, J. H., KIM, K. H. Metal organic frameworks (MOFs): Currents trends and challenges in control and management of air quality. *Korean Journal of Chemical Engineering*. 2019. 36, 1839.
- 70) LAWAL, A., WONG, R. C. S., TAN, G. H., ABDULRA'UF, L. B., ALSHARIF, A. M. A. Recent Modifications and Validation of QuEChERS-dSPE Coupled to LC–MS

- and GC–MS Instruments for Determination of Pesticide/Agrochemical Residues in Fruits and Vegetables: Review. *Journal of Chromatographic Sciences*. 2018. 56, 656-669.
- 71) MA, J. P., YAN, F. L., CHEN, F. X., JIANG, L. H., LI, J. H., CHEN, L. X. C18-functionalized magnetic silica nanoparticles for solid phase extraction of microcystin-LR in reservoir water samples followed by HPLC DAD determination. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. 2015. 38, 655-661.
- 72) LI, J. H., DONG, R. C., WANG, X. Y., XIONG, H., XU, S. F., SHEN, D. Z., SONG, X. L., CHEN, L. X. One-pot synthesis of magnetic molecularly imprinted microspheres by RAFT precipitation polymerization for the fast and selective removal of 17 β -estradiol. *RSC Advances*. 2015. 5, 10611-10618.
- 73) PANSERI, S., CATALANO, A., GIORGI, A., ARIOLI, F., PROCOPIO, A., BRITTI, D., CHIESA, L. M. Occurrence of pesticide residues in Italian honey from different areas in relation to its potential contamination sources. *Food Control*. 2014. 38, 150–156.
- 74) RAO, T. N., GAIKWAD, S., NAIDU, T. M., HAN, S. Extraction and determination of pesticide residues in water using carbon nanotubes coupled with gas chromatography-mass spectroscopy. *Korean Journal of Chemical Engineering*. 2020. 37, 1042-1049.
- 75) ZHAO, Q., LU, Q., FENG, Y. Q. Dispersive microextraction based on magnetic polypyrrole nanowires for the fast determination of pesticide residues in beverage and environmental water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2013. 405, 4765-4776.
- 76) FARAJZADEH, M. A., MOGADDAM, M. R. A., GHORBANPOUR, H. Development of a new microextraction method based on elevated temperature dispersive liquid-liquid microextraction for determination of triazole pesticides residues in honey by gas chromatography-nitrogen phosphorus detection. *Journal of Chromatography A*. 2014. 1347, 8–16.

- 77) MALHAT, F. M., HAGGAG, M. N., LOUTFY, N. M., OSMAN, M. A. M., AHMED, M. T. Residues of organochlorine and synthetic pyrethroid pesticides in honey, an indicator of ambient environment, a pilot study. *Chemosphere*. 2015. 120, 457–461.
- 78) CAMPILLO, N., VINAS, P., PENALVER, R., CACHO, J. I., HERNANDEZ-CORDOBA, M. Solidphase microextraction followed by gas chromatography for the speciation of organotin compounds in honey and wine samples: A comparison of atomic emission and mass spectrometry detectors. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2012. 25, 66–73.
- 79) STOCKA, J., TANKIEWICZ, M., BIZIUK, M., NAMIEŚNIK, J. Green Aspects of Techniques for the Determination of Currently Used Pesticides in Environmental Samples. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011. 12, 7785–7805.
- 80) SALAMI, F. H., QUEIROZ, M. E. C. Microextraction in packed sorbent for the determination of pesticides in honey samples by gas chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography Science*. 2013, 51, 899–904.
- 81) BARGANSKA, Z., SLEBIODA, M., NAMIESNIK, J. Pesticide residues levels in honey from apiaries located of Northern Poland. *Food Control*. 2013. 31, 196–201.
- 82) PARADIS, D., BÉRAIL, G., BONMATIN, J., BELZUNCES, L. P. Sensitive analytical methods for 22 relevant insecticides of 3 chemical families in honey by GC-MS/MS and LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2014. 406, 621–633.
- 83) WANG, B., COTE, A. P., FURUKAWA, H., O'KEEFFE, M., YAGHI, O. M. Colossal cages in zeolitic imidazolate framework as selective carbon dioxide reservoirs. *Nature*. 2008. 453, 207-211.
- 84) ZHOU, Y. Y., YAN, X. P., KIM, K. N., WANG, S. W., LIU, M. G. Exploration of coordination polymer as sorbent for flow injection solid-phase extraction on-line coupled with high-performance liquid chromatography for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental materials. *Journal of Chromatography A*. 2006. 1116, 172-178.
- 85) BAGHERI, A., TAGHIZADEH, M., BEHBAHANI, M., ASGHARINEZHAD, A. A., SALARIAN, M., DEGHANI, A., EBRAHIMZADEH, H., AMINI, M. M. Synthesis and characterization of magnetic metal-organic framework (MOF) as a novel sorbent,

- and its optimization by experimental design methodology for determination of palladium in environmental samples. *Talanta*. 2012. 99, 132-139.
- 86) HU, Z., PENG, Y., KANG, Z., QIAN, Y., ZHAO, D. A modulated hydrothermal (MHT) approach for the facile synthesis of UiO-66-type MOFs. *Inorganic Chemistry*. 2015. 54, 4862-4868.
- 87) PISCOPO, C. G., POLYZOIDIS, A., SCHWARZER, M., LOEBBECKE, S. Stability of UiO-66 under acidic treatment: opportunities and limitations for post-synthetic modifications. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2015. 208, 30-35.
- 88) LI, Z., LIU, Q., LU, X., DENG, C., SUN, N., YANG, X. Magnetic metal-organic framework nanocomposites for enrichment and direct detection of environmental pollutants by negative-ion matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Talanta*. 2019. 194, 329-335.
- 89) BAGHERI, N., KHATAEE, A., HASSANZADEH, J., HABIBI, B. Sensitive biosensing of organophosphate pesticides using enzyme mimics of magnetic ZIF-8. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2019, 209, 118-125.
- 90) KIM, M. L., OTAL, E. H., HINESTROZA, J. P. Cellulose meets reticular chemistry: Interactions between cellulosic substrates and metal-organic frameworks. *Cellulose*. 2019, 26, 123–137.
- 91) LU, W. G., WEI, Z. W., GU, Z. Y., LIU, T. F., PARK, J., PARK, J., TIAN, J., ZHANG, M., ZHANG, Q., GENTLE, T., BOSH, M., HONG-CAI, Z. Tuning the structure and function of metal-organic frameworks via linker design. *Chemical Society Reviews*. 2014. 43, 5561–5593.

- 92) BURNETT, B. J., BARRON, P. M., CHOE, W. Recent advances in porphyrinic metal-organic frameworks: Materials design, synthetic strategies, and emerging applications. *CrystEngComm*. 2012. 14, 3839–3846.
- 93) DHAKA, S., KUMAR, R., DEEP, A., KURADE, M. B., JI, S. W., JEON, B. H. Metal-organic frameworks (MOFs) for the removal of emerging contaminants from aquatic environments. *Coordination Chemistry Reviews*. 2019. 380, 330–352.
- 94) JOSEPH, L., JUN, B.- M., JANG, M., PARK, C. M., MUÑOZ-SENMACHE, J. C., HERNÁNDEZ-MALDONADO, A. J., HEYDEN, A., YU, M., YOON, Y. Removal of contaminants of emerging concern by metal-organic framework nanoadsorbents: A review. *Chemical Engineering Journal*. 2019. 369, 928–946.
- 95) ABID, H. R., RADA, Z. H., SHANG, J., WANG, S. B. Synthesis, characterization, and CO₂ adsorption of three metal-organic frameworks (MOFs): MIL-53, MIL-96, and amino-MIL-53. *Polyhedron*. 2016. 120, 103–111.
- 96) SAHIN, F., TOPUZ, B., KALIPCILAR, H. Synthesis of ZIF-7, ZIF-8, ZIF-67, and ZIF-L from recycled mother liquors. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2018. 261, 259–267.
- 97) WANG, K., GU, J. W., YIN, N. Efficient removal of Pb(II) and Cd(II) using NH₂-functionalized Zr-MOFs via rapid microwave-promoted synthesis. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2017. 56, 1880–1887.
- 98) NOBAR, S. N. Cu-BTC synthesis, characterization and preparation for adsorption studies. *Materials Chemistry and Physics*. 2018. 213, 343–351.
- 99) LEE, Y. R., CHO, H., JANG, M. S., KWON, H. J. ZIF-8: A comparison of synthesis methods. *Chemical Engineering Journal*. 2015. 271, 276–280.

- 100) ZHANG, J., WEI, Y., LI, H., ZENG, E. Y., YOU, J. Application of Box–Behnken design to optimize multi-sorbent solid phase extraction for trace neonicotinoids in water containing high level of matrix substances. *Talanta*. 2017. 170, 392–398.
- 101) GHIASI, A., MALEKPOUR, A., MAHPISHANIAN, S. Metal-organic framework MIL101 (Cr)-NH₂ functionalized magnetic graphene oxide for ultrasonic-assisted magnetic solid phase extraction of neonicotinoid insecticides from fruit and water samples. *Talanta*. 2020. 217, 121120.
- 102) SECCIA, S., FIDENTE, P., BARBINI, D. A., MORRICA, P. Multiresidue determination of nicotinoid insecticide residues in drinking water by liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Chimica Acta*. 2005. 553, 21–26.
- 103) SUGANTHI, A., BHUVANESWARI, K., RAMYA, M. Determination of neonicotinoid insecticide residues in sugarcane juice using LC/MS/MS. *Food Chemistry*. 2018. 241, 275–280.
- 104) CHEN, M., COLLINS, E. M., TAO, L., LU, C. Simultaneous determination of residues in pollen and high-fructose corn syrup from eight neonicotinoid insecticides by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2013. 405, 9251–9264.
- 105) CAO, X., JIANG, Z., WANG, S., HONG, S., LI, H., SHAO, Y., SHE, Y., WANG, J., JIN, F., JIN, M. One-pot synthesis of magnetic zeolitic imidazolate framework/grapheme oxide composites for the extraction of neonicotinoid insecticides from environmental water samples. *Journal of Separation Sciences*. 2017. 40, 4747–4756.
- 106) CAO, X., LIU, G., SHE, Y., JIANG, Z., JIN, F., JIN, M., DU, P., ZHAO, F., ZHANG, Y., WANG, J. Preparation of magnetic metal organic framework composites for the

- extraction of neonicotinoid insecticides from environmental water samples. *RSC Advances*. 2016. 6, 113144–113151.
- 107) CARBONELL-ROZAS, L., LARA, F. J., DEL OLMO, I. M., GARCÍA-CAMPAÑA, A. M. Micellar electrokinetic chromatography as efficient alternative for the multiresidue determination of seven neonicotinoids and 6-chloronicotinic acid in environmental samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2020. 412, 6231–6240.
- 108) MCMANUS, M. M., OATES, R. P., SUBBIAH, S., KLEIN, D., CAÑAS-CARRELL, J. E. Matrix-matched standards in the liquid chromatography–mass spectrometry determination of neonicotinoids in soil and sediment. *Journal of Chromatography A*. 2019. 1602, 246–252.

PUBLIKAČNÍ ČINNOST

A1 – publikace v zahraničních a mezinárodních recenzovaných časopisech (časopisy s IF)

Arbër Frangu, Kateřina Pravcová, Petra Šilarová, Tahir Arbnesi, Milan Sýs. Flow injection tyrosinase biosensor for direct determination of acetaminophen in human urine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **411** (2019) 2415-2424.

Amir Shaaban Farag, Kateřina Pravcová, Karel Vytrás, Milan Sýs. Simultaneous Determination of Caffeine and Pyridoxine in Energy Drinks using Differential Pulse Voltammetry at Glassy Carbon Electrode Modified with Nafion®. *Electroanalysis*. **31** (2019) 1511-1516.

Mariola Brycht, Anna Łukawska, Michaela Frühbauerová, Kateřina Pravcová, Radovan Metelka, Sławomira Skrzypek, Milan Sýs. Rapid monitoring of fungicide fenhexamid residues in selected berries and wine grapes by square-wave voltammetry at carbon-based electrodes. *Food Chemistry*. **338** (2021) 127975.

Héctor Martínez-Pérez-Cejuela, Kateřina Pravcová, Lenka Česlová, Ernesto F. Simó-Alfonso, José Manuel Herrero-Martínez. Zeolitic imidazolate framework-8 decorated with gold nanoparticles for solid-phase extraction of neonicotinoids in agricultural samples. *Microchimica Acta*. **188** (2021) 197.

Lenka Česlová, Kateřina Pravcová, Miroslava Juričová, Jan Fischer. Rapid HPLC/MS/MS analysis of phenolic content and profile for mead quality assessment. *Food Control*. **134** (2022) 108737.

A2- publikace v ostatních vědeckých recenzovaných časopisech

Kateřina Pravcová, Milan Sýs, Karel Vytrás, Lenka Česlová. Determination of caffeine and glucose in selected energy drinks. *Scientific Papers of the University of Pardubice, Series A* **24** (2018) 31-38.

Kateřina Pravcová, Nikola Macháčková, Lenka Česlová. Determination of selected pesticides in honey and mead by HPLC. *Scientific Papers of the University of Pardubice, Series A* **26** (2020) 125-137.

Kateřina Pravcová, Tomáš Mikysek, Lenka Česlová. Comparison of HPLC and electrochemical determination of 5-hydroxymethylfurfural in honey and mead samples *Scientific Papers of the University of Pardubice, Series A* **26** (2020) 139-146.

B2- Postery v AJ na konferencích v zahraničí či na významných mezinárodních konferencích pořádaných v ČR

Kateřina Pravcová, Lenka Česlová. Determination of free polyphenols in buckwheat. 32nd International Symposium on Chromatography, Cannes Mandelieu – Francie, 23-27.9.2018, 155.

Kateřina Pravcová, Lenka Česlová. Determination of free polyphenols in buckwheat using RP-HPLC/MS/MS analysis. 12th Symposium on high-performance separation methods, Siófok – Maďarsko, 11. – 13. 9. 2019.

C1- Přednášky na domácích konferencích

Kateřina Pravcová, Miroslava Juričová, Jan Fischer, Lenka Česlová. HPLC/MS/MS analýza polyfenolických látek obsažených v medovinách, 19. slovenská studentská vedecká konferencia, Bratislava, 9.11.2017, 43, 978-80-89597-77-2.

Kateřina Pravcová, Barbora Řeháková, Lenka Česlová. Analýza látek s antioxidačními vlastnostmi v kávě. Monitorování cizorodých látek v životním prostředí XVIII., Kojetín, 10. – 12. 4. 2019

C3- Ostatní příspěvky ve sbornících konferencí

Plnotextový sborník

Kateřina Pravcová, Miroslava Juričová, Jan Fischer, Lenka Česlová. HPLC/MS/MS analýza polyfenolických látek obsažených v medovinách, Monitorování cizorodých látek v životním prostředí XVII., Ovčárna pod Pradědem, 25. – 27. 4. 2018, 89-100, 978-80-7560-154-4.

Lenka Česlová, Barbora Řeháková, Kateřina Pravcová. Influence of Decaffeination of Coffee on Chlorogenic Acids Content. 32nd International Symposium on Chromatography, Cannes Mandelieu – Francie, 23-27.9.2018, 171.

Denisa Vraná, Kateřina Pravcová, Lenka Česlová. Vliv klíčení na obsah volných fenolických látek v pohance. Studentská vědecká odborná činnost 2018/2019. Pardubice, 2019. s. 235-240, 978-80-7560-260-2.

PŘÍLOHY

Tabulka P1: Koncentrace (mg/l) vybraných fenolických látek v jednotlivých vzorcích medovin a celkové množství všech monitorovaných fenolických látek bez obsahu vanilinu.

Zkratky: GalA – gallová kyselina, DHBA – dihydroxybenzoová kyselina, DHBd – dihydroxybenzaldehyd, HBA – hydroxybenzoová kyselina, Van – vanilin, ChlA – chlorogenová kyselina, GenA – gentisová kyselina, CafA – kávová kyselina, FerA – ferulová a isoferulová kyselina, *p*-coA – *p*-kumarová kyselina, *m*-coA – *m*-kumarová kyselina, SalA – salicylová kyselina, Quer – Kvercetin, Apig – apigenin.

č.	GalA	DHBA	DHBd	HBA	Van	ChlA	GenA	CafA	FerA	<i>p</i> -coA	<i>m</i> -coA	SalA	Quer	total*
1	3,18	3,56	1,02	6,94	<LOQ	<LOD	0,12	2,42	3,18	2,42	<LOQ	0,90	<LOD	23,79
2	1,87	2,46	1,04	3,79	<LOD	0,63	0,04	0,79	1,09	0,42	0,45	0,35	<LOD	12,98
3	1,07	1,54	0,55	3,79	<LOD	<LOD	0,03	0,29	2,16	0,84	0,57	0,33	<LOD	11,23
4	0,32	2,64	0,91	7,42	<LOD	<LOD	<LOD	0,20	2,63	2,84	1,04	0,57	<LOQ	18,64
5	2,39	2,41	0,61	6,69	<LOD	0,09	0,05	0,94	1,84	2,40	0,26	0,86	<LOQ	18,63
6	5,42	6,00	0,78	9,81	<LOD	<LOD	0,17	3,09	3,02	4,14	<LOQ	1,58	<LOQ	34,09
7	0,48	1,09	0,43	281	<LOD	37,5	0,57	8,01	4,92	3,57	<LOD	0,19	1,77	61,43
8	0,53	3,99	0,15	5,23	<LOD	<LOQ	0,30	2,03	2,07	1,48	<LOQ	2,82	<LOQ	18,68
9	3,98	17,2	1,36	19,1	<LOD	0,61	0,39	8,42	4,80	2,67	<LOQ	1,90	5,55	67,43
10	<LOQ	1,81	0,18	4,28	<LOD	<LOD	0,05	1,03	2,94	2,73	<LOQ	0,92	0,76	14,78
11	0,44	1,69	0,93	5,47	<LOD	<LOD	0,01	0,42	2,08	2,25	<LOQ	0,35	<LOQ	13,71
12	0,82	1,12	0,31	2,85	<LOD	0,55	0,08	0,81	2,03	1,61	<LOQ	0,29	0,77	11,31
13	0,74	1,34	0,75	2,61	22,0	0,21	0,04	0,76	3,04	2,47	<LOQ	0,28	0,87	13,19
14	1,46	0,62	0,22	2,50	0,39	0,11	0,04	0,49	0,89	0,90	<LOD	0,13	<LOD	7,41
15	<LOD	0,14	1,55	<LOQ	155	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOQ	0,07	<LOQ	1,81
16	0,38	1,28	0,23	4,03	<LOD	0,44	0,03	0,44	1,95	1,69	<LOQ	0,18	<LOQ	10,7

č.	GalA	DHBA	DHBd	HBA	Van	ChIA	GenA	CafA	FerA	p-coA	m-coA	SalA	Quer	total*
17	<LOQ	2,06	0,51	5,88	<LOD	<LOD	<LOD	0,14	1,96	2,24	0,83	0,43	<LOD	14,11
18	<LOQ	1,33	0,73	1,40	15,5	0,90	<LOQ	0,36	<LOQ	0,44	<LOQ	0,14	<LOD	5,35
19	<LOD	0,10	0,15	<LOQ	0,88	0,93	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	1,23
20	0,42	1,06	<LOQ	3,87	<LOD	0,28	<LOQ	1,76	1,98	0,97	<LOQ	0,15	0,79	11,5
21	0,94	1,56	0,38	3,29	11,4	0,65	0,06	0,97	2,70	2,20	<LOD	0,13	<LOQ	12,94
22	0,74	1,14	1,34	2,89	9,87	0,42	0,05	0,88	2,19	2,07	<LOD	0,15	<LOD	11,92

Tabulka P2: Koncentrace vybraných fenolických látek v jednotlivých vzorcích pohanky během klíčení v $\mu\text{g/g}$ sušiny.

Zkratky: K – kroupa, L – lámanka, TMF – 5,4,7-trimetoxyflavan, PBA – protokatechová benzoová kyselina, DTMF – dihydroxytrimetoxyflavan, CAH – hexóza kyseliny kávové, EG – epicatechin galát, CH – katechin hexóza, E-3-3-O-MG – epicatechin-3-3-O-methylgalát, SWM – swertiamakrosid, E-4,6-E – epiafzelchin-4,6-epikatechin, PC B – procyanidin B, E-E-O-MG – epiafzelchin-epikatechin-O-methylgalát, PC B2-3-O-G – procyanidin B2 3-O-galát, PC B2 DG – procyanidin B2 dimethylgalát, EEE – epiafzelchin-epikatechin-epiafzelchin, PCT – procyanidin trimer, Cat- katechin, Vit – vitexin, Queri – kvercitrin, Ori – orientin, Hyp – hyperosid, Rut – rutin, Epi – epicatechin, 3,4-DHB – 3,4-dihydroxybenzoová kyselina, CafA – kávová kyselina, *p*-coA – *p*-kumarová kyselina, IsoQ – isokvercitrin, Que – kvercetin, *m*-coA – *m*-kumarová kyselina, ChlA – chlorogenová kyselina, Nar – naringenin, Fla – 7-hydroxyflavon, HBA – hydroxybenzoová kyselina.

KROUPA									
	1. DEN KLÍČENÍ			2. DEN KLÍČENÍ			3. DEN KLÍČENÍ		
	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3
TMF	14,3	17,4	18,4	15,6	20,1	22,1	17,34	16,9	15,8
PBA 1	12564	12087	11201	11399	11403	12156	12250	11916	12936
PBA 2	38966	37487	34740	35353	35363	37701	37992	36955	40118
DTMF	26,2	30,1	27,8	23,5	27,5	29,3	18,2	26,7	30,2
CAH 1	1,69	2,33	2,55	2,05	2,28	2,92	2,19	2,07	2,25
CAH 2	8916	8578	7950	8090	8093	8627	8694	8457	9180
CAH 3	5,20	7,27	6,88	7,27	6,97	11,18	9,90	7,97	8,43
EG	6,23	8,24	5,99	4,98	5,21	7,64	8,07	8,51	6,18

KROUPA									
	DEN KLÍČENÍ			DEN KLÍČENÍ			DEN KLÍČENÍ		
	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3
CH	229	302	290	294	327	318,3	290	258	225
E-3-3-O-MG	5,04	6,11	4,94	3,54	4,55	3,48	2,61	3,19	2,89
SWM	14,2	17,6	14,5	16,1	16,6	16,1	14,7	14,00	15,0
E-4,6-E 1	5,76	6,78	6,25	5,00	6,93	4,11	3,10	3,83	3,87
E-4,6-E 2	3,04	3,25	2,92	2,49	3,20	2,00	1,79	1,84	2,20
PC B	26,1	25,3	23,4	23,8	23,9	25,4	25,7	25,0	27,1
E-E-O-MG	3,79	4,20	3,70	3,03	4,02	2,59	2,03	2,32	2,92
PC B2-3-O-G	26,5	25,8	23,84	24,1	24,2	25,8	26,0	25,4	27,2
PC B2 DG	26,3	25,3	23,5	23,8	23,9	25,34	25,5	24,8	26,9
EEE	5,29	5,84	5,41	4,19	5,70	2,91	2,73	3,08	3,37
PCT	26,1	25,1	23,3	23,7	23,7	25,4	25,5	24,8	26,9
Cat	93,1	143	154	123	120	221	127	150	135
Vit	6,24	9,79	8,32	22,0	16,3	135,4	83,4	67,3	98,0
Queri	0,18	0,17	0,15	0,12	0,12	0,15	0,14	0,12	0,14
Ori	7,92	12,6	10,9	24,4	19,0	110,7	73,2	57,0	77,0
Hyp	1,08	1,08	1,10	1,56	1,94	1,58	1,15	1,38	1,26
Rut	2141	2064	1917	1952	1952	2085	2095	2034	2207
Epi	24,6	35,0	31,3	30,6	29,9	64,8	40,9	42,1	406
3,4-DHB	12566	12090	11204	11402	11405	1215	122252	119,18	12938
CafA	0,23	0,32	0,23	0,21	0,28	0,24	0,22	0,83	0,67
pCoA	1624	1565	1450	1475	1476	1573	1585	1542	1674
IsoQ	1,04	1,04	1,09	1,53	1,86	1,54	1,13	1,38	1,20
Que	0,85	1,09	0,94	0,95	0,86	1,52	1,66	50,05	8,61

KROUPA									
	DEN KLÍČENÍ			DEN KLÍČENÍ			DEN KLÍČENÍ		
	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3
mCoA	5,27	8,92	6,21	6,20	6,74	6,62	6,91	6,15	6,71
ChIA	1560	1503	1393	1418	1419	1515	1524	1484	1609
Nar	16,77	17,9	16,51	16,7	19,9	22,2	20,7	22,2	26,9
Fla	0,02	0,03	0,04	0,02	0,03	0,03	0,04	0,03	0,03
HBA	356,97	366	348	300	373	375	376	365	371

LÁMANKA									
	1. DEN KLÍČENÍ			2. DEN KLÍČENÍ			3. DEN KLÍČENÍ		
	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3
TMF	26,6	25,2	21,8	19,72	22,5	17,9	18,1	16,7	22,5
PBA 1	13109	12790	12250	11261	10724	11167	11202	10494	11704
PBA 2	10654	39667	37992	34925	33259	34631	34742	32545	36298
DTMF	46,8	39,8	49,4	43,1	43,8	34,7	24,8	27,0	25,8
CAH 1	2,07	1,77	1,59	1,65	1,72	1,55	1,26	1,42	1,66
CAH 2	9303	9077	8694	7992	7611	7925	7950	7448	8306
CAH 3	5,68	5,54	5,45	5,70	5,16	6,18	5,08	5,58	7,21
EG	2,05	2,19	2,26	2,74	1,24	2,65	1,43	2,07	4,76
CH	242	227	223	247	250	207	166	205	181
E-3-3-O-MG	3,11	4,25	4,83	3,04	2,95	3,59	1,20	1,72	2,07
SWM	13,6	13,4	11,6	12,3	13,0	11,4	10,1	9,84	12,4
E-4,6-E 1	5,02	4,93	3,40	3,40	3,46	2,82	1,35	1,82	1,21
E-4,6-E 2	3,03	3,65	3,61	3,18	3,23	2,98	1,00	1,63	1,12

LÁMANKA									
	DEN KLÍČENÍ			DEN KLÍČENÍ			DEN KLÍČENÍ		
	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3
PC B	27,5	26,9	25,8	23,9	22,8	23,6	23,6	22,2	24,7
E-E-O-MG	3,64	4,17	3,89	3,77	3,12	3,10	1,24	1,95	1,44
PC B2-3-O-G	27,2	26,7	25,5	23,6	22,3	23,3	23,2	21,9	24,5
PC B2 DG	27,4	26,8	25,7	23,6	22,6	23,41	23,3	21,9	24,3
EEE	5,73	6,06	5,27	4,92	4,88	4,00	1,48	2,66	1,84
PCT	27,1	26,5	25,3	23,3	22,2	23,1	23,2	21,7	24,3
Cat	56,1	52,6	59,1	64,8	51,4	67,0	39,3	54,6	77,3
Vit	6,22	7,02	9,50	10,5	9,44	20,2	20,4	11,2	99,1
Queri	0,24	0,20	0,31	0,24	0,28	0,32	0,15	0,12	0,19
Ori	8,15	7,85	10,4	10,5	11,0	20,1	15,7	11,8	78,2
Hyp	1,86	1,83	1,64	2,43	2,50	2,22	1,71	1,55	1,60
Rut	2232	2179	2100	1939	1847	1919	1915	1799	2008
Epi	13,6	11,75	12,1	12,6	8,92	17,4	5,95	9,83	25,2
3,4-DHB	13112	12793	12253	11264	10726	11169	11205	10497	11707
CafA	0,47	0,43	0,25	0,25	0,39	0,34	0,42	0,20	0,42
pCoA	1698	1656	1587	1459	1390	1448	1452	1360	1518
IsoQ	1,92	1,79	1,63	2,33	2,49	2,15	1,67	1,49	1,49
Que	3,49	4,20	3,49	3,46	3,08	3,30	11,2	2,25	5,99
mCoA	8,73	9,82	10,3	9,76	9,42	9,18	8,85	7,40	9,59
ChlA	1630	1591	1523	1401	1334	1389	1394	1306	1458
Nar	35,7	39,48	39,3	35,4	34,7	35,7	34,6	33,9	37,4
Fla	0,05	0,05	0,04	0,04	0,04	0,04	0,03	0,04	0,03
HBA	408	389	361	342	338	346	347	334	355

Tabulka P3: Koncentrace (mg/g) sledovaných fenolických látek v jednotlivých extraktech připravených z amarantových zrn.

Značení	Látka	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
1	Glykosid 4-HBA	4,669	4,454	4,432	3,448	4,635	3,429	3,297	0,392	0,436	1,366
2	Glykosid 4-HBA	–	–	–	0,541	0,395	0,332	0,324	0,235	0,271	–
3	Glykosid vanilové k.	744,8	702,3	758,9	659,8	718,5	608,4	589,8	524,5	581,7	263,8
4	3,4-DHBA	0,027	0,005	0,022	0,02	0,02	0,022	0,025	0,053	0,065	0,041
5	Glykosid vanilové k.	410,7	393,2	403,2	339,5	399,1	343,9	330,5	290,9	315,9	147,2
6	Glykosid 4-HBA	3,767	2,386	3,641	3,361	2,947	3,052	3,134	2,200	3,140	2,779
7	Glykosid ferulové k.	0,432	0,307	0,403	0,338	0,253	0,252	0,294	0,246	0,291	0,304
8	Glykosid 4-HBA	4,915	4,830	4,767	4,075	4,867	3,740	3,939	4,178	4,836	2,506
9	Glykosid 4-HBA	0,823	0,796	0,790	0,706	0,823	0,692	0,691	0,707	0,769	0,445
10	Glykosid vanilové k.	56,27	52,55	57,31	51,31	51,96	49,7	132,6	10,047	–	15,93
11	Glykosid vanilové k.	4,031	2,125	2,230	2,125	2,453	2,687	3,181	2,077	2,144	1,556
12	Glykosid vanilové k.	3,907	3,574	3,814	3,507	3,544	3,460	3,523	1,511	1,709	1,855
13	4-HBA	1,420	1,512	1,61	1,483	1,599	1,386	1,421	4,308	5,312	1,516
14	Glykosid ferulové k.	4,789	4,479	4,678	4,086	4,713	3,878	3,649	0,922	0,942	1,670
15	Kávová k.	0,007	0,042	–	0,001	0,061	0,004	0,002	0,053	0,041	0,049
16	Vanilová k.	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
17	Kaffeoylchinová k.	0,057	0,046	0,09	0,092	0,021	0,106	0,091	0,040	0,061	0,007
18	Kaffeoylchinová k.	0,035	0,007	0,013	0,013	0,004	0,008	0,011	0,008	0,088	0,019

Značení	Látka	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
19	Rutin	0,507	0,607	0,553	0,487	0,607	0,576	0,556	0,110	0,122	0,176
20	Kumaroylchinová k.	0,309	0,097	0,327	0,313	0,212	0,330	0,296	0,098	0,148	0,212
21	<i>p</i> -kumarová k.	0,271	0,203	0,229	0,234	0,29	0,235	0,230	0,297	0,275	0,275
22	Isokvercitrin	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	–	–	–
23	Kumaroylchinová k.	0,126	0,044	0,112	0,091	0,038	0,052	0,074	0,034	0,065	0,115
24	Feruoylchinová k.	2,319	0,931	2,348	2,334	1,674	2,414	2,126	0,853	1,102	1,372
25	Kaempferol-rutinosid	2,536	2,529	2,707	2,247	1,886	2,272	2,256	0,475	0,622	1,036
26	Feruoylchinová k.	1,233	0,706	1,203	0,970	0,546	0,558	0,763	0,604	0,774	1,155
27	Ferulová k.	0,252	0,225	0,244	0,244	0,251	0,237	0,228	0,233	0,216	0,216
28	Ferulová k.	0,252	0,267	0,245	0,227	0,219	0,191	0,214	0,244	0,227	0,254
29	Myricetin	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
30	Salicylová k.	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
31	Kvercetin	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
32	Kaempferol	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Značení	Látka	Alkalická hydrolýza	Kyselá hydrolýza	Alkalická hydrolýza pevného podílu	Alkalická hydrolýza vodného podílu	Kyselá hydrolýza vodného podílu
1	Glykosid 4-HBA	0,257	0,223	–	0,237	–
2	Glykosid 4-HBA	–	0,245	–	–	–
3	Glykosid vanilové k.	126,5	28,14	3,162	200,76	6,234
4	3,4-DHBA	0,508	0,462	0,363	0,037	0,143
5	Glykosid vanilové k.	–	–	–	–	–
6	Glykosid 4-HBA	–	–	–	–	–
7	Glykosid ferulové k.	0,175	0,153	–	0,184	–
8	Glykosid 4-HBA	–	–	–	–	–
9	Glykosid 4-HBA	–	–	–	–	–
10	Glykosid vanilové k.	–	–	–	–	–
11	Glykosid vanilové k.	–	–	–	–	–
12	Glykosid vanilové k.	0,235	–	–	–	–
13	4-HBA	12,94	13,86	2,544	4,624	12,65
14	Glykosid ferulové k.	0,378	0,169	–	0,168	–
15	Kávová k.	2,945	0,330	1,524	0,053	0,002
16	Vanilová k.	–	–	–	–	11,84
17	Kaffeoylchinová k.	–	–	–	–	0,018
18	Kaffeoylchinová k.	–	0,004	–	–	–

Značení	Látka	Alkalická hydrolýza	Kyselá hydrolýza	Alkalická hydrolýza pevného podílu	Alkalická hydrolýza vodného podílu	Kyselá hydrolýza vodného podílu
19	Rutin	0,027	0,007	–	0,04	–
20	Kumaroylchinová k.	0,015	0,302	–	–	–
21	<i>p</i> -kumarová k.	2,744	1,658	2,169	0,291	0,025
22	Isokvercitrin	0,001	–	–	–	–
23	Kumaroylchinová k.	–	0,013	–	–	–
24	Feruoylchinová k.	0,158	1,729	–	–	–
25	Kaempferol-rutinosid	0,395	0,012	–	0,330	–
26	Feruoylchinová k.	0,160	0,414	–	–	–
27	Ferulová k.	12,14	2,119	13,84	0,720	–
28	Ferulová k.	11,95	1,265	8,97	0,769	–
29	Myricetin	–	–	–	–	–
30	Salicylová k.	0,067	0,045	–	–	–
31	Kvercetin	0,002	0,05	0,001	0,001	0,016
32	Kaempferol	–	–	–	–	0,009

Tabulka P4: Průměrné hodnoty celkového množství fenolických látek v extraktech amarantových zrn v mg/g.

Značení	c [mg/g vzorku]
E1	0,4694 ± 0,0136
E2	0,2868 ± 0,01
E3	0,4964 ± 0,0167
E4	0,4952 ± 0,0196
E5	0,3111 ± 0,0138
E6	0,4264 ± 0,0184
E7	0,4229 ± 0,0208
E8	0,1344 ± 0,0188
E9	0,2053 ± 0,0375
E10	0,1201 ± 0,0123
Extrakt po kyselé hydrolýze	0,2881 ± 0,0548

Tabulka P5: Srovnání s ostatními současnými publikovanými meto

Analyty ^a	Materiál ^b (množství sorbentu)	Metoda ^b	Vzorek	Dávkovaný objem (mL)	Návratnost (%)	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$; $\mu\text{g g}^{-1}$)	Reference	
1–4	LiChrolut (200 mg)	EN	SPE-LC-ESI-MS	Pitná voda	3	95–104	0.01; –	[102]
1–6	HLB/GCB (200 mg)		SPE-HPLC-MS/MS	Užitková voda	6	34–116	0.002–0.007; –	[100]
1–5	Fe ₃ O ₄ /ZIF-67/GO (40 mg)		MSPE-HPLC-MS/MS	Environmental water	3	84–117	0.06–1.0; –	[105]
1, 2	MGO/MIL-101(Cr)-NH ₂ (20 mg)		UA-MSPE-HPLC-DAD	Ovoce a voda	1	82–102	0.019–0.022; –	[101]
1–5, 7	MOF-199/Fe ₃ O ₄ (50 mg)		MSPE-HPLC-MS/MS	Environmental water	1.5	88–107	0.3–1.5; –	[106]
1–7	Oasis (60 mg)	HLB	SPE- or SLE-MEKC-DAD	Voda a půda	1–12	73–107	0.1–0.4; 0.001–0.0029	[107]
1,2,3,4	QuEChERS (5 g)		d-SPE-MM-LC-MS/MS	Půda a sediment	15	56–103	-; 1.4–3.4	[108]
1–5	QuEChERS (>5 g)		d-SPE-LC-ESI-MS/MS	Šťáva z cukrové třtiny	20	62–130	-; 0.0007–0.002	[103]
1–8	QuEChERS (>5 g) + C18 (50 mg)		d-SPE-LC-MS/MS	Pyl a fruktózový kukuřičný sirup	10–13	85–114	-; 0.03–0.1	[104]
1–5	AuNPs@NH ₂ (C ₄)-ZIF-8 (20 mg)		SPE-HPLC-DAD	Zemědělské vzorky	0.5	80–110	0.019–0.041; 0.4–0.8—	Tato publikace

