



Aplikace polyfenolů na textilní substráty

Disertační práce

Studijní program: P3106 – Textilní inženýrství
Studijní obor: 3106V015 – Textilní technika a materiálové inženýrství
Autor práce: **Ing. Bc. Hana Křížová**
Vedoucí práce: prof. Ing. Jakub Wiener, Ph.D.





TECHNICAL UNIVERSITY OF LIBEREC
Faculty of Textile Engineering ■

Application of polyphenols on textile substrates

Dissertation

Study programme: P3106 – Textile Engineering
Study branch: 3106V015 – Textile Technics and Materials Engineering
Author: **Ing. Bc. Hana Křížová**
Supervisor: prof. Ing. Jakub Wiener, Ph.D.



Prohlášení

Byla jsem seznámena s tím, že na mou disertační práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé disertační práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li disertační práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědoma povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Disertační práci jsem vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé disertační práce a konzultantem.

Současně čestně prohlašuji, že tištěná verze práce se shoduje s elektronickou verzí, vloženou do IS STAG.

Datum:

Podpis:

Anotace

Polyfenoly přítomné v rostlinách jsou látky s mnoha zajímavými vlastnostmi, jejichž příčinou jsou četné fenolové skupiny. Jsou to silné antioxidanty, mnohé mají schopnost chelátovat kovy, váží se s aminokyselinami a na základě těchto vlastností mají i řadu biogenních účinků: chrání buňky před oxidačním stresem a volnými radikály a tím i před poškozením subbuněčných struktur, stárnutím, degenerací a řadou chorob. Mnohé jsou zkoumány jako farmaka s protizánětlivými, protinádorovými, kardioprotektivními, antivirovými i antimikrobiálními účinky. Fenolové skupiny fungují u těchto látek často jako auxochromy a zároveň místa vhodná pro interakci s textilními substráty, a tak je možné některé z těchto látek využít jako přírodní barviva k barvení přírodních i syntetických vláken. Řadu původních biogenních vlastností vnášejí tato „funkční barviva“ i do textilií, které tak vedle ekologického a přírodního barvení získávají i další „přidanou hodnotu“. Pro nastínění dalších možností využití rostlinných polyfenolů je podán i stručný přehled jejich biologických a technických aplikací v kombinaci s vláknými substráty, ovšem hlavním těžištěm této práce je řešení těchto interakcí především z pohledu textilního barvení. U vybraných barviv jsou diskutovány nejen běžné stálosti, použití mořidel, vliv podmínek barvení na výsledný odstín a typy vznikajících chemických vazeb, ale i ekologické aspekty tohoto barvení s důrazem na využití barevných zemědělských, lesnických a potravinářských odpadů.

Klíčová slova: polyfenoly, taniny, anthokyany, betalainy, flavonoidy, přírodní barviva

Annotation

Polyphenols present in plants are substances with various remarkable properties that are caused by number of phenolic groups. They are powerful antioxidants; many of them are able to chelate metals and bind with amino acids. Based on these properties polyphenols have a number of biogenic effects: they protect cells against oxidative stress and free radicals and thus against damage of subcellular structures, aging, degeneration and the number of other diseases. Many of them are studied as pharmaceuticals with anti-inflammatory, anticancer, cardioprotective, antiviral and antimicrobial effects. Phenolic groups of these substances often act as auxochromes as well as sites for interaction with textile substrates, therefore it is possible to use them as natural dyes for dyeing natural and synthetic fibres. These "functional dyes" bring a number of their biogenic properties into textiles, that in addition to environmental and natural dyeing acquire more "added value". A brief overview of biological and technical applications of plant polyphenols in combination with fibrous substrates is presented to outline their other uses, but the main focus of this work is on a solution of these interactions from point of view of textile dyeing. On selected dyes are discussed not only ordinary fastness, use of mordants, effect of dyeing conditions on the final hue or type of resulting chemical bonds, but also ecological aspects with emphasis on utilisation of agricultural, forestry and food wastes for this type of dyeing.

Keywords: polyphenols, tannins, anthocyanins, betalains, flavonoids, natural dyes

Annotation

In den Pflanzen anwesenden Polyphenolen sind Substanzen mit vielen interessanten Eigenschaften, deren Ursachen die zahlreichen phenolischen Gruppen sind. Sie sind starke Antioxidanten, haben die Fähigkeit Metalle zu chelatisieren, mit Aminosäuren sich zu binden und auf Grund dieser Eigenschaften haben sie eine Reihe von biogenen Wirkungen. Sie schützen die Zellen vor oxidativem Stress und freien Radikalen und somit vor Beschädigungen der subzellulären Strukturen, vor Alterung, Degeneration und vor einer Anzahl der Erkrankungen, viele von ihnen werden als Heilmittel mit entzündungshemmenden, Krebs, Herz schützenden anti-viralen und anti-mikrobiellen Wirkungen untersucht. Phenolgruppen funktionieren bei diesen Stoffen häufig als Auxochrome und gleichzeitig als Stellen, geeignet für eine Interaktion mit Textilsubstraten und so ist es möglich, einige dieser Substanzen als natürliche Farbstoffe zum Färben von natürlichen und synthetischen Fasern zu verwenden. Eine Reihe origineller biogener Eigenschaften dieser "funktioneller Farbstoffe" tragen sie in das Gewebe ein, welches so neben den ökologischen und natürlichen Färben noch andere "Mehrwerte" gewinnt. Als Entwurf weiterer Anwendungsmöglichkeiten der pflanzlichen Polyphenole ist hier ein kurzer Überblick über die biologischen und technischen Anwendungen in Verbindung mit Fasersubstraten gegeben, jedoch der Schwerpunkt dieser Arbeit ist hauptsächlich die Lösung der Interaktionen aus der Perspektive der Textilfärberei. Diskutiert ist nicht nur die gemeine Farbechtheit, Verwendung von Beizen, Einfluss beim Färben auf den Farbton und Arten der entstehenden chemischen Bindungen, sondern auch die ökologischen Aspekte dieser Färbung, mit Betonung auf die Verwertung der farbigen Landwirtschafts-, Forst- und Lebensmittelabfälle.

Schlüsselwörter: Polyphenole, Tannine, Anthocyane, Betalaine, Flavonoide, natürliche Farbstoffe

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala všem, kteří mne při mém studiu nějakým způsobem provázeli, podporovali a ovlivnili.

Především děkuji své rodině – manželovi, synovi a mamince, bez jejichž lásky, trpělivosti, tolerance a zázemí by nic z toho, o co jsem v několika posledních letech studia usilovala, nebylo možné a nesjplš by to ani nemělo žádný smysl. Vím, že není lehké žít s někým, kdo je většinu času ponořený do svého badatelského světa. A také si dobře uvědomuji, že já jsem ten, kdo v našem vztahu více bere, než dává a pochybuji, že jim kdy budu moci vynahradit to, co pro mne dělají.

Můj velký dík patří panu prof. Kryštůfkovi za jeho mnohé cenné rady, povzbuzení a podporu. Svým moudrým nadhledem a rozumným uvažováním tam, kde já ho občas ztrácím, mi už několik let nahrazuje mého milovaného tatínka, který nás předčasně opustil v průběhu mého bakalářského studia.

Chci poděkovat také svému školiteli, prof. Wienerovi, především za to, že byl vždy ochotně k dispozici ke konzultacím a diskuzím o vědeckém tématu. Diplomatické jednání, klid a rozvaha za každých okolností, to jsou vlastnosti, které na něm obdivuji. Jeho názorů, doporučení a odborných rad si velmi cením, i když ne vždy se jimi řídím. Oceňuji i to, že se mnou vždy jednal jako s rovnocenným partnerem, navrhoval a ukazoval možnosti, avšak řešení problémů i se všemi důsledky ponechával zcela na mém rozhodnutí.

Poděkovat chci i nejmenovaným lidem, kteří moji cestu studiem znesnadňovali, činili trnitou a místy i bolestnou. Především díky nim jsem zase o kousek dál na cestě poznání. Je snadné mít úspěch, když vás lidé okolo podporují, milují, zametají cestičky a servírují kariéru na zlatém podnosu – ale kdo by si takového štěstí vážil? Hodnota úspěchu, kterého jsme dosáhli vlastním úsilím, vytrvalostí a především překonáváním překážek, je nesrovnatelná. Proto věřím, že vše negativní a zlé mne v důsledku posílilo a že jsem díky tomu snad i maličko moudřejší.

Dnes už vím, že to hlavní, co jsem studiem získala, nejsou vědomosti, ale poznání sebe sama.

Cesta je cíl.

Obsah

Úvod.....	1
1. Rozdělení a vlastnosti polyfenolů	2
2. Polyfenoly v textilním barvení	5
2.1 Barvení přírodními barvivy	5
2.2 Mořidla	6
2.3 Vybraná přírodní fenolová barviva.....	9
2.3.1 Flavonoidy	9
2.3.2 Anthokyany	12
2.4 Betalainy	19
2.5 Analytické metody	21
2.5.1 Analýza rostlinných fenolů	21
2.5.2 Analýza anthokyanů	22
2.5.3 Cyklická voltametrie	24
2.6 Využití odpadů v textilním barvení	28
2.6.1 Barevné rostlinné odpady	29
2.6.2 Barvení taniny	31
2.6.3 Barvení anthokyany	33
2.6.4 Barvení betalainy	38
3. Antioxidační vlastnosti polyfenolů	41
4. Antibakteriální vlastnosti polyfenolů.....	44
5. UV protektivní vlastnosti polyfenolů	47
6. Technické aplikace polyfenolů.....	48
6.1 Vyčiňování kůží	48
6.2 Výroba pryskyřic a stavebních materiálů	48
6.3 Výroba protikorozních nátěrů	49
6.4 Odstraňování kovových iontů z vody	49
6.5 Odstranění zápachu ze surové vlny	49
6.6 Tvorba nanočástic kovů	50
6.7 Vazba taninů s některými syntetickými polymery	50
7. Biomedicínské aplikace polyfenolů	51
7.1 Síťování kolagenu	51
7.2 Síťování elastinu	52
7.3 Léčba popálenin	53
7.4 Hojení ran	55
8. Použité a studované materiály	56
8.1 Zdroje rostlinných polyfenolů použité k experimentům	56
8.2 Textilní materiály použité k experimentům	56
8.3 Metody	56
8.3.1 Extrakce barviv a barvení textilií	56
8.3.2 Analýza extraktů a obarvených tkanin	56
9. Přehled dosažených výsledků	64
9.1 Základní analýza barvicích materiálů	64
9.1.1 Sušení	64
9.1.2 Kvantifikace obsahu polyfenolů a taninů	65
9.2 Experimenty s dubovou kůrou	68

9.2.1 Extrakce katechinů a taninů	68
9.2.2 Barvení dubovou kůrou a stálostí	71
9.2.3 Antibakteriální vlastnosti	75
9.2.4 Zdravotní nezávadnost	76
9.3 Experimenty s réвовými výlisky	79
9.3.1 Extrakce anthokyanů	79
9.3.2 Degradace anthokyanů	81
9.3.3 Barvení réвовými výlisky a stálostí	88
9.3.4 Zdravotní nezávadnost	94
9.4 Experimenty s červenou řepou	99
9.4.1 Extrakce betalainů	99
9.4.2 Barvení červenou řepou a stálostí	100
9.4.3 Zdravotní nezávadnost	102
9.5 Experimenty se žlutými květy	105
9.5.1 Moření vlněné tkaniny chloridem cínatým	105
9.5.2 Barvení mořené vlněné tkaniny žlutými květy, stálostí	106
9.5.3 UV protektivní vlastnosti tkanin obarvených žlutými květy	108
9.6 Testování antioxidačních vlastností polyfenolů	114
9.6.1 Cyklická voltametrie	114
9.6.2 Porovnání antioxidační aktivity vybraných látek	119
10. Závěr	122
11. Seznam použité literatury	124
12. Práce autora se vztahem ke studované problematice	134

Seznam obrázků

Obr.1	Kyselina gallová a ellagová	3
Obr.2	Kyselina tříslová	3
Obr.3	Flavan-3-ol	3
Obr.4	Kondenzovaný tanin	3
Obr.5	Floroglucinol	4
Obr.6	Katechin	4
Obr.7	Kvercetin, alizarin a lawsone (henna)	5
Obr.8	Vznik komplexů o-fenolových skupin s ionty kovů	6
Obr.9	Základní struktura flavonoidů	9
Obr.10	Rozdělení flavonoidů	10
Obr.11	Kvercetin	11
Obr.12	Luteolin	11
Obr.13	Základní struktura antokyanů	12
Obr.14	Anthokyan oenin obsažený ve víně (=malvidin-3-O-glukosid)	14
Obr.15	Strukturní změny anthokyanidinů v různém pH	15
Obr.16	Degradační index 1 rok starého višňového kompotu	18
Obr.17	Degradační index 35 let starého višňového kompotu	18
Obr.18	Vulgaxanthin	20
Obr.19	Betanidin	20
Obr.20	Ukázka chromatogramu vína s UV/VIS detektorem (520 nm)	23
Obr.21	Popis cyklického voltamogramu	24
Obr.22	Dvou- a tříelektrodové zapojení článku pro cyklickou volumetrii	26
Obr.23	Pokles odezvy při opakovaném skenu CV vlivem adsorpce analytu na pracovní elektrodu	27
Obr.24	Záznamy prvních skenů téhož roztok (0.5 mM kyselina gallová)	27
Obr.25	Ukázka z knihy "Secreti" Alessia Piemonteseho z r. 1555	33
Obr.26	Ideální krystalografická struktura hexaakvahlinitého a hexaakvaželeznatého kationtu s vyznačenými vzdálenostmi mezi kyslíky vodných ligandů (hodnoty v angströmech)	34
Obr.27	Vzdálenosti kyslíků v hydroxylových skupinách kvercetinu	35
Obr.28	Modely vazby Fe ⁺² a kvercetinu	35
Obr.29	Rozložení parciálních nábojů na kvercetinu, označeny pozice s největším rozdílem, (nejreaktivnější místa)	36
Obr.30	Reaktivní místa ve flavonoidech (oxidace, chelatace)	36
Obr.31	Model molekuly glukopyranózy se vzdálenostmi molekul kyslíku	37
Obr.32	Asymetrická struktura hexaakvahlinitého kationtu obklopeného 10 methansulfonátovými anionty v tris methansulfonátu hexaakvahlinitem ([Al(H ₂ O) ₆](CH ₃ O ₃ S) ₃)	38
Obr.33	Nepřavděpodobný chelatační model soustavy barvivo – mořidlový kationt – bavlna	38
Obr.34	Změny elektrického náboje betaninu v různém pH	39
Obr.35	Oxidace kyseliny askorbové	43
Obr.36	Dvojitý mechanismus oxidace polyfenolů	43
Obr.37	Fenolformaldehydová pryskyřice	48
Obr.38	Kolagen	52
Obr.39	Elastin	52
Obr.40	Léčba popálenin Tannafaxem (léčivý gel tanin + 0,5% fenol)	53
Obr.41	Průběh standardizovaných funkcí E _λ a S _λ	58
Obr.42	Průběh záření výbojky Ultramed 400	59
Obr.43	Absorpční spektrum Folinova činidla indikujícího přítomnost fenolů	61
Obr.44	Stabilní radikál DPPH	62
Obr.45	Průběh absorpčního spektra DPPH	62

Obr.46	Kalibrační přímka a kalibrační rovnice pro výpočet obsahu polyfenolů (standard: kyselina gallová)	65
Obr.47	Absorpční spektra extraktů z dubové kůry	68
Obr.48	Nárůst absorbance extraktu z dubové kůry v 736 nm po reakci s Folinovým činidlem v závislosti na době extrakce při 90 °C	68
Obr.49	Množství vyextrahované kyseliny tříslové v závislosti na teplotě (60 minut) vyjádřené absorbancí po reakci s Folinovým činidlem	69
Obr.50	Nárůst koncentrace polyfenolů ve vodné lázni při extrakci dubové kůry a při zvyšování množství extrahovaného materiálu v jedné lázni (90 °C)	69
Obr.51	Množství získané kyseliny tříslové vyjádřené v % hmotnosti extrahovaného materiálu při zvyšování koncentrace dubové kůry v extrakční lázni (90 °C, 1 hodina extrakce)	69
Obr.52	Tkaniny barvené extraktem z dubové kůry, 100%, 50% a 25 % odpovídá obsahu 80, 40 a 20 g suché drčené kůry /litr barvicí lázně	71
Obr.53	Vytahovací křivky polyamidu, vlny a bavlny při barvení dubovou kůrou (70 °C)	73
Obr.54	Linearizace Vickerstaffovy kinetické rovnice	74
Obr.55	Barevné změny doprovázející „zhášení“ radikálu DPPH	82
Obr.56	Průběh kontinuální extrakce antokyanů	83
Obr.57	Nárůst absorbance při lázně extrakci anthokyanů v závislosti na teplotě	83
Obr.58	Nárůst absorbance při lázně extrakci anthokyanů v závislosti na době extrakce	83
Obr.59	Nárůst absorbance při lázně extrakci anthokyanů v závislosti na koncentraci extrahovaného materiálu (zde: sušené slupky z révy, které byly ze směsi vylisků separovány)	84
Obr.60	Vývoj degradačního indexu anthokyanů v průběhu několikahodinového varu extraktu z vylisků	84
Obr.61	Pokles obsahu anthokyanů v roztoku během varu	84
Obr.62	Postupné odbarvování šťávy z černého bezu při pH 12	85
Obr.63	Pokles obsahu barviva v extraktu z révových slupek v průběhu ozařování UV-A (barevnost měřena po 30 minutách od přidání KCl/HCl pufru pH 1 při 520 nm)	85
Obr.64	Pokles obsahu celkových polyfenolů v extraktu ze slupek a jadérek révy při expozici UV-A zářením	85
Obr.65	Prodloužení doby zhášení radikálu DPPH extrakty ze slupek a jadérek révy vystavených různě dlouhé době UV-A záření	86
Obr.66	Zleva doprava: nemořená tkanina - tkanina mořená taninem – tkanina mořená kamencem	89
Obr.67	Shora dolů jsou patrné zóny vystavené 0, 2, 4 a 8 h UV záření. Zleva doprava: trojice barvené při pH 2.5 - 3.9 - 4.6, pořadí vzorků v každé trojici: nemořeno – mořeno taninem – mořeno kamencem	90
Obr.68	Tkaniny barvené anthokyanem (extraktem z vylisků z modré révy, odrůda Fratava), 100%, 50% a 25 % odpovídá obsahu 80, 40 a 20 g suchých vylisků/litr barvicí lázně	91
Obr.69	Tkaniny barvené vylisky z modré révy (předmořené kamencem, 0.5 – 2.0 – 5.0 – 15.0 g/litr)	92
Obr.70	VIS absorpční spektra betalainů odebíraných v různém čase extrakce	99
Obr.71	Změny absorbance v abs.maximech 476 a 534 nm v závislosti na době extrakce barviv z červené řepy	99
Obr.72	VIS absorpční spektra řepného extraktu v různém pH (stejná koncentrace)	100
Obr.73	Časově-teplotní režim moření a barvení tkanin červenou řepou	100
Obr.74	Tkaniny obarvené červenou řepou (tkaniny mořené kamencem, 3 g/litr)	101
Obr.75	Tkaniny obarvené červenou řepou (nahore mořené, dole nemořené, zleva doprava: kyselé – neutrální- zásadité barvení. Vlněná tkanina.	101
Obr.76	Tkaniny obarvené červenou řepou (nahore mořené, dole nemořené, zleva doprava: kyselé – neutrální- zásadité barvení. Polyamidová tkanina.	101

<i>Obr.77</i>	<i>Mořená vlněná tkanina obarvená řepou (vlevo 100% WO, vpravo směšová tkanina 80% WO, 20% PA)</i>	<i>101</i>
<i>Obr.78</i>	<i>Neupravená vlna (SEM, 2500x)</i>	<i>105</i>
<i>Obr.79</i>	<i>Vlna mořená SnCl₂ o koncentraci 6 g/litr (SEM, 2500x)</i>	<i>105</i>
<i>Obr.80</i>	<i>UV/VIS absorpční spektra vodných extraktů ze žlutých květů</i>	<i>107</i>
<i>Obr.81</i>	<i>Hyper- a bathochromní posun UV/VIS spektra extraktu z květů zlatice po přidání chloridu cínatého</i>	<i>107</i>
<i>Obr.82</i>	<i>K/S funkce tkanin obarvených žlutými květy</i>	<i>107</i>
<i>Obr.83</i>	<i>Remisní křivky vlny ošetřené cínatou solí (blank) a tkanin obarvených různými žlutými květy</i>	<i>109</i>
<i>Obr.84</i>	<i>Transmise záření o vln.délce 290 - 400 nm u nacinované vlny (blank) a u tkanin obarvených žlutými květy z tab.33</i>	<i>109</i>
<i>Obr.85</i>	<i>Cyklovoltamogramy 0.5 mM kyseliny gallové při různých skenovacích rychlostech</i>	<i>114</i>
<i>Obr.86</i>	<i>Lineární závislost pikového proudu na 2. odmocnině skenovací rychlosti</i>	<i>114</i>
<i>Obr.87</i>	<i>Cyklovoltamogramy červeného vína Côte de Nuits (2011), ředění 10x až 800x</i>	<i>115</i>
<i>Obr.88</i>	<i>Cyklovoltamogramy bílého vína Les Chais de Bacchus (2008), ředění 10 x a 40x</i>	<i>115</i>
<i>Obr.89</i>	<i>Cyklovoltamogramy 0.5 mM kyseliny askorbové vystavené působení ozónu (0, 1 a 3 min.)</i>	<i>116</i>
<i>Obr.90</i>	<i>Cyklovoltamogramy 0.5 mM kyseliny tříslové vystavené působení ozónu (0, 1 a 3 min.)</i>	<i>116</i>
<i>Obr.91</i>	<i>UV spektrum kyseliny askorbové po ozonizaci (0 až 20 minut)</i>	<i>117</i>
<i>Obr.92</i>	<i>UV spektrum kyseliny tříslové po ozonizaci (0 až 20 minut)</i>	<i>117</i>
<i>Obr.93</i>	<i>Zhášení radikálu DPPH po přidání 50 µl taninu o koncentraci 0.2 g/litr</i>	<i>119</i>
<i>Obr.94</i>	<i>Cyklický voltamogram kyseliny askorbové (3 po sobě jdoucí skeny)</i>	<i>120</i>
<i>Obr.95</i>	<i>Cyklický voltamogram kondenzovaných taninů</i>	<i>120</i>

Seznam tabulek

Tab.1	Nejvýznamnější anthokyanidiny	12
Tab.2	Rozlišovací chemické testy pro anthokyany a betakyany	19
Tab.3	Typická absorpční maxima některých anthokyanů v přítomnosti okyseleného ethanolu nebo methanolu	22
Tab.4	Poločas rozpadu některých ROS	41
Tab.5	Porovnání subjektivního a objektivního hodnocení barevné odchylky ΔE	57
Tab.6	Povolené max. limity kovů vyluhovatelných z textilií do simulovaného potu	60
Tab.7	Sesychací poměry a složení révových výlisků	64
Tab.8	Naměřené hodnoty absorbancí (736 nm) po reakci s Folinovým činidlem a jejich statistické vyhodnocení	66
Tab.9	Chemická analýza extraktů použitých k experimentům	66
Tab.10	$L^*a^*b^*$ hodnoty tkanin z obr.52	71
Tab.11	Stálosti tkanin obarvených dubovou kůrou v koncentraci 80 g dubové kůry/ litr	72
Tab.12	Koncentrace a vytažení z lázně polyamidové, vlněné a bavlněné tkaniny při barvení extraktem z dubové kůry (při 70 °C)	73
Tab.13	Přehled kinetických charakteristik barvení polyamidové, vlněné a bavlněné tkaniny extraktem z dubové kůry při 70 °C	75
Tab.14	Pokles počtu CFU po 4 a 24 h kontaktu s obarvenou PA tkaninou srovnáním s neobarveným blankem	75
Tab.15	Pokles antibakteriální účinnosti obarvených PA tkanin po 8 h kontaktu s bakteriálním inokulem u vypraných tkanin ve srovnání s tkaninou neobarvenou, vyjádřeno vzestupem počtu narostlých CFU vůči blanku	75
Tab.16	Obsah těžkých kovů v extraktu z dubové kůry a ve vyluzích tkanin obarvených dubovou kůrou	76
Tab.17	Kinetika rozkladu anthokyanů z černého bezu v zásaditém prostředí	84
Tab.18	Hodnoty $L^*a^*b^*$ a odstínové změny (GSR) při UV osvětlení nemořené tkaniny a barvené při různém pH	90
Tab.19	Hodnoty $L^*a^*b^*$ a odstín. změny (GSR) při UV osvětlení tkaniny mořené taninem a barvené při různém pH	90
Tab.20	Hodnoty $L^*a^*b^*$ a odstín. změny (GSR) při UV osvětlení tkaniny mořené kamencem a barvené při různém pH	90
Tan.21	$L^*a^*b^*$ hodnoty tkanin z obr.68	91
Tab.22	$L^*a^*b^*$ hodnoty tkanin z obr.69	93
Tab.23	Stálosti nemořených tkanin obarvených révovými výlisky v koncentraci 40 g suchých výlisků/litr (středně silné vybarvení z obr.69)	94
Tab.24	Obsah kovů v extraktech a ve vyluzích z obarvených i neobarvených tkanin bez moření, (ICP analýza), hodnoty jsou v mg a $\mu\text{g}/\text{kg}$ tkaniny	94
Tab.25	EDS analýza obsahu některých kovů v povrch.vrstvě tkanin obarvených anhtokyany z révových výlisků odrůdy Fratava v koncentraci 80 g suchých výlisků/litr a mořených kamencem v konc. 0 – 15 g/litr	95
Tab.26	pH vodných výluhů obarvených tkanin	95
Tab.27	$L^*a^*b^*$ hodnoty tkanin z obr.74	101
Tab.28	Stálosti tkanin obarvených červenou řepou (předmořeno kamencem, 3 g/litr) v množství 60 g sušené řepné drti / litr barvicí lázně a s poměrem lázně 1:50	102
Tab.29	Obsah těžkých kovů v extraktu z červené řepy a ve vyluzích tkanin obarvených červenou řepou	102
Tab.30	Přehled rostlin s obsahem žlutých barviv v květech použitých k barvení vlněné tkaniny	105

Tab.31	EDS analýza vlněné tkaniny mořené různými koncentracemi SnCl ₂ s barvením i bez barvení	106
Tab.32	L*a*b* hodnoty vlněné tkaniny obarvené květem zlatice při různé koncentraci předmoření cínatou solí	106
Tab.33	L*a*b* hodnoty tkanin obarvených různými žlutými květy (koncentrace SnCl ₂ 2 g/litr, množství květů 200 g /litr, poměr lázně 1:100)	106
Tab.34	Stálosti vlněných tkanin obarvených žlutými květy	108
Tab.35	Porovnání obsahu fenolů v květech a schopnost obarvené tkaniny zhaset volné radikály vyjádřená v barevném rozdílu na barevné ose b (systém CIE-Lab) po aplikaci 10 μL roztoku DPPH	108
Tab.36	UPF hodnoty testovaných obarvených tkanin	109
Tab.37	Změny antioxidační aktivity po 45 minutách při 80 °C	120
Tab.38	Změny antioxidační aktivity po 45 minutách při 100 °C	120
Tab.39	Deaktivace radikálu DPPH antioxidanty – přehled objemů, hmotností a látkových množství	121

Seznam zkratek

CFU	colony-forming units (jednotky tvořící kolonie)
C.I.	Color index
CO	bavlna
CV	cyklická voltametrie, cyklický voltamogram
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPPH	1,1- difenyl 2- pikrylhydrazyl
G+	grampozitivní bakterie
G-	gramnegativní bakterie
hm., hmotn.	hmotnost
hm.%	hmotnostní procenta
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie
ICP	emisní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem
konc., koncentr.	koncentrace
K/S	Kubelka-Munkova funkce
kys.	kyselina
nPF	polyfenoly neadsorbovatelné na kožní prášek
obr.	obrázek
ot./min.	otáčky za minutu
PC	papírová chromatografie
pm	pikometry (10^{-12}m)
PA	polyamid
RONS	kyslíkaté a dusíkaté radikály
ROS	kyslíkaté radikály
SEM	skenovací elektronový mikroskop
SFE	superkritická fluidní extrakce
tab.	tabulka
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
TPF	celkové polyfenoly
TSA	Trypton - sójový agar
TSB	Trypton – sójový bujón
UVA	ultrafialové záření A
UVB	ultrafialové záření b
UV/VIS	spektrum ultrafialového a viditelného záření
v/v	objemový podíl
WO	vlna
%E	procento vytažení barviva z lázně

Úvod

Rostlinné polyfenoly jsou intenzivně studovány již zhruba od 80. let minulého století. Jedná se o širokou skupinu látek s řadou zajímavých účinků, z nichž nejstudovanější je jejich antioxidační aktivita ve vztahu k lidskému zdraví. I když množství publikací, které se zabývají polyfenoly, především zhruba od konce 80. let minulého století exponenciálně roste, publikace popisující interakce polyfenolů s textilními substráty nejsou příliš početné a mají hojnější zastoupení pouze v oblasti mořidel a přírodního barvení.

Spojení textilních materiálů s polyfenoly ve skutečnosti otevírá zajímavé možnosti v mnoha různých aplikacích. Cílem této práce je v teoretické části podat stručný přehled vlastností, výskytu a použití rostlinných polyfenolů, dále zmapovat tuto problematiku pro další výzkum a v experimentální části ověřit využití a potenciál některých rostlinných odpadů a materiálů, se zaměřením na interakce v nich obsažených vybraných fenolických látek a barviv s textilními vlákny a mořidlovými solemi.

I když by se mohlo zdát, že práce je věnována pouze barvířské tematice, není tomu tak: právě unikátní vlastnosti přírodních polyfenolických látek vnášejí do textilního substrátu vedle barvy i další „přidanou hodnotu“, jako jsou např. antioxidační vlastnosti, schopnost zhaset volné kyslíkaté radikály, ochrana před UV zářením, antibakteriální vlastnosti, schopnost pohlcovat pachy nebo sorbovat ionty kovů. Předmětem mého studia a testování byly tedy nejen barevné charakteristiky tkanin obarvených přírodními substráty, jako jsou barevnost a běžné stálosti, ale i další zmíněné vlastnosti, které jsou diskutovány se zřetelem k jejich chemické struktuře a interakcím s textilními vlákny.

Aplikace polyfenolů na vlákenné substráty lze zjednodušeně rozdělit do tří okruhů:

- **textilní barvení**, jehož součástí je kromě barvení s využitím rostlin a moření také hledání možnosti efektivního zhodnocení zemědělských odpadů a jejich využití k barvení textilií
- **technické aplikace**, jako je např. příprava nanočástic a nanoporézních struktur chemickou redukcí v přítomnosti polyfenolů, funkcionalizace nanovláken, výroba pryskyřic, čištění vody kontaminované ionty kovů, výroba textilií odolných vůči plísním a hnilobě nebo některé méně obvyklé aplikace, jako je odstraňování zápachu z ovčí vlny pomocí taninů
- **biomedicínské aplikace**, mezi které patří především zpevňování biopolymerních tkáňových nosičů ve tkáňovém inženýrství a vývoj materiálů pro léčbu a krytí ran včetně využití antibakteriálních vlastností těchto materiálů

Práce si neklade za cíl podat vyčerpávající přehled polyfenolů – nejedná se o review, proto jsou v přehledu některé části zmíněny pouze stručně, některé vynechány a některé probrány podrobněji. Pozornost je věnována především látkám a skupinám látek, které byly předmětem mého studia a experimentů – taninům, flavonoidům, anthokyanům a vzhledem k dostupnosti barevných odpadů a podobnosti barevných vlastností červené řepy s materiály obsahujícími anthokyaniny byla práce rozšířena ještě o betalainy.

1. Rozdělení a vlastnosti polyfenolů

Polyfenoly jsou (nejen) rostlinné látky, které představují chemicky velmi různorodé sloučeniny, jejich společným pojítkem je obsah hydroxylových skupin vázaných na aromatickém jádře či jádrech. Jsou to snadno oxidovatelné látky s nízkým redox potenciálem, které jsou schopné redukovat látky s oxidačními účinky a reaktivní volné radikály. Mnoho polyfenolických látek tvoří důležitou složku naší potravy, protože jsou obsaženy v zelenině, ovoci, obilovinách, luštěninách, bramborách, čokoládě, semenech, ořechách, koření a nápojích rostlinného původu (čaje, káva, pivo, víno, džusy). Jako silné antioxidanty výrazně přispívají k ochraně organismu a pomáhají chránit naše buňky před oxidačním poškozením. Polyfenoly vykazují řadu fyziologických, biogenních a dalších účinků, např. protizánětlivé, vazodilatační, antibakteriální, antivirové, adstringentní (svíravé), spasmolytické, antiagregační, hepatoprotektivní, antialergenní, cytostatické, chelatační, enzymově inhibiční či naopak stimulační a jsou používány v potravinářství, farmacii a kosmetice.¹⁻¹⁰

Rostlinné polyfenoly zahrnují několik tisíc látek, které se dělí do 4 velkých skupin: **fenolové kyseliny, flavonoidy, stilbeny a lignany**. Asi nejvíce studovanou skupinou jsou flavonoidy, které se dále dělí na anthocyanidiny, flavonoly, flavanoly, flavanony, chalkony aj. Mnohé z těchto látek se vyskytují v glykosidických vazbách, substituované různými organickými kyselinami a také v různých polymeračních stupních – od monomerů, oligomerů až k polymerním látkám – taninům.^{6, 11, 12, 13}

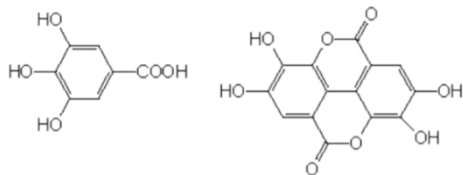
Taniny

Rostlinné **taniny** jsou ve vodě rozpustné polymerní polyfenolické sloučeniny, které se nacházejí v nejrůznějších částech rostlin, jako je dřevo, kůra stromů, ovocné slupky, lusky, listy, kořeny a hálky rostlin. Vznikají jako sekundární metabolity v rostlinách, jsou to tedy látky, které se přímo neúčastní růstu, vývoje nebo rozmnožování rostlin, ale dlouhodobě slouží k ochraně rostlin před škůdci, parazity a nepříznivými podmínkami.¹⁴

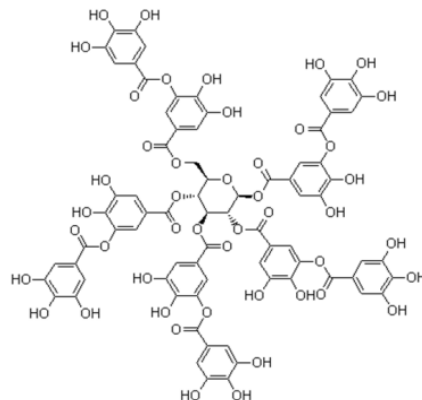
Termín „tanin“ pochází ze starého keltského výrazu pro dub, který je dodnes populárním zdrojem tříslovin používaných od starověku až do poměrně nedávné doby běžně k vyčiňování kůží (obsahuje 6 - 16 % tříslovin).

Taniny jsou látky se širokým spektrem biogenních účinků. Často se jedná o hořké látky a adstringencia - léčiva se svíravým účinkem, která tlumí žlázkové sekrece, působí lokální zúžení cév, mají protiprůjmový účinek apod. Obsah taninů v rostlinách silně kolísá v závislosti na vegetačních podmínkách (teplota, výživa, sluneční svit). Na taniny jsou obecně bohatší dřeviny tropického i mírného pásma (dubová kůra, kebračo) než např. traviny, ale i zde existují výjimky. Prostřednictvím svých fenolových a karboxylových skupin tvoří komplexy s různými látkami - především s proteiny (koagulace bílkovin, na které je založen proces vyčiňování kůží), aminokyselinami a alkaloidy. Komplexy tvoří i s ionty kovů, s polysacharidy a tuky. Obecně platí, že taniny jsou ve vodě rozpustné látky, ale jejich rozpustnost klesá s rostoucím polymeračním stupněm.

Rozdělení taninů vychází z celkového jednoduchého dělení polyfenolů Edwina Haslama:¹⁰ **Hydrolyzovatelné taniny**, jejichž monomerní jednotky tvoří kyselina gallová a ellagová (obr.1), které jsou pospojovány esterovými vazbami, případně navázány na cukerný základ, nejčastěji glukózu. Tyto látky se hydrolyzují působením tepla, slabých kyselin nebo slabých bází. Jsou také snadněji rozložitelné trávicími enzymy savců. Jejich relativní molekulová hmotnost se pohybuje od 500 do 3000.



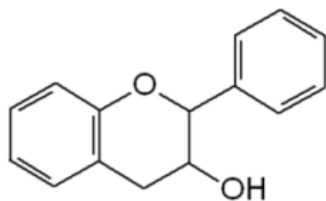
Obr.1 Kyselina gallová a ellagová



Obr.2 Kyselina tříslová

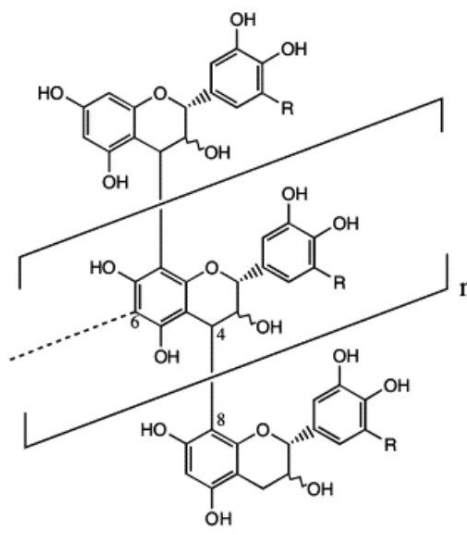
Jsou dobře rozpustné ve vodě a proto i dobře přístupné reakcím s dalšími látkami. Jejichž typickým zástupcem je kyselina tříslová (obr.2), která byla poprvé izolována z extraktu z čínské škumy. Kyselina tříslová je oligomer složený z 2-12 jednotek kyseliny gallové, konvenčního chemického vzorce $C_{76}H_{52}O_{46}$. Kyselina tříslová se používá např. v textilním barvířství jako mořidlo při barvení celulósových vláken, dále ve farmaceutickém průmyslu jako látka s protiprůjmovým účinkem, dříve byla používána jako antidotum při otravě houbami a dokonce i při otravě strychninem, během 1. světové války jako prostředek k léčbě popálenin. ^{11, 12, 13}

Druhou skupinu taninů představují taniny **kondenzované**, jejichž monomerní jednotky (flavan-3-oly, obr.3) jsou spojeny pevnými kovalentními vazbami. Velká rozmanitost kondenzovaných taninů je dána nejen různým stupněm polymerace (nejčastěji 2-20 jednotek) s molekulovou hmotností i nad 20 000, ale i obsahem různých podjednotek, které mohou být do polymerů konjugovány (např. kyselina gallová nebo kumarová). Kondenzované taniny obsahují pevné vazby mezi uhlíky, a proto nejsou tak snadno hydrolyzovatelné a v trávicím traktu savců jsou velmi těžko rozložitelné. Flavanolové monomery se spojují nejčastěji v pozicích 4 a 8 (obr.4), ale mohou se spojit i v jiných pozicích, např. 4 a 6.



Obr.3 Flavan-3-ol

Kondenzované taniny jsou také nazývány proanthokyanidiny, protože jejich oxidační depolymerizací (v prostředí butanol-HCl)¹⁵ vznikají různé anthokyanidiny, proto mají tyto taniny názvy jako prodelphinidin, propelargonidin apod. Konkrétně v semenech révy jsou obsaženy prokyanidiny, které jsou tvořeny 2 - 50 i více jednotkami flavan-3olu.



Obr.4 Kondenzovaný tanin

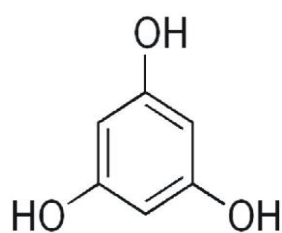
Zatímco kyselina tříslová je součástí lékopisu (*German Pharmacopeia*) již od roku 1941 a je široce zkoumána a využívána i přes podezření z hepatotoxicity¹⁶, kondenzované taniny se teprve stávají předmětem intenzivního studia.

Bohatým zdrojem hydrolyzovatelných taninů jsou kůry stromů především mírného pásma - bývají extrahovány např. z listů sicilské škumpy (*Rhus coriara*), z plodů a kůry různých dubů nebo z lusků jihoamerické tary (*Caesalpinia spinosa*), z kaštanu (*Castanea sativa*), přičemž taniny povahy katechinu lze nalézt spíše v tropických stromech.¹⁷

Kondenzované taniny se hromadí hlavně ve vakuolách a dále v epidermální a subepidermální vrstvě listů a ovoce. Jejich nejbohatším zdrojem jsou různé stromy, především velmi tvrdé jihoamerické dřevo kebračo (rody *Schinopsis* a *Aspidosperma*), dále tropické stromy *Lithocarpus Glaber*, a *Commiphora angolensii* nebo dřevo z akácie.¹⁸

Vyšší obsah kondenzovaných taninů ve tmavém ovoci, zelenině a semenech (červené fazole, kakaové boby, modrá réva) souvisí s obsahem anthokyanů, což jsou látky flavonoidní povahy. Vyskytují se typicky ve slupkách a peckách bobulí vinné révy a vznikají podobnými metabolickými cestami jako anthokyaniny obsažené v červeném víně.¹²

Jak již bylo mnohokrát prokázáno, kondenzované taniny i oligomerní proanthokyanidiny fungují nejen jako lapače volných radikálů a jako antioxidanty in vivo i in vitro, ale mnohé vykazují i další farmakologické efekty, např. protizánětlivé, antimikrobiální, protitrombotické, kardioprotektivní, vazodilatační atd.¹⁹

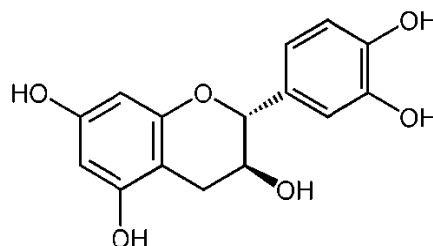


Obr.5 Floroglucinol

Pro úplnost uvedme ještě další dvě skupiny taninů – **florotaniny a katechiny**.

Florotaniny jsou deriváty floroglucinolu (obr.5). Vyskytují se především v hnědých mořských řasách a jsou intenzivně studovány pro některé výjimečné vlastnosti – jsou to velmi silné antioxidanty, které zpomalují stárnutí buněk vlivem UV záření a některé dokonce selektivně inhibují enzym reverzní HIV-1 transkriptázu.²⁰

Další skupinou taninů jsou **katechiny** (obr.6), které tvoří přechodnou skupinu mezi hydrolyzovatelnými a kondenzovanými taniny a kombinují vlastnosti a složení obou. Jsou obsaženy např. v čajových lístcích a kakaových bobech a je jim připisován nespočet léčivých a blahodárných účinků na lidský organismus.



Obr.6 Katechin

2. Polyfenoly v textilním barvení

2.1 Barvení přírodními barvivy

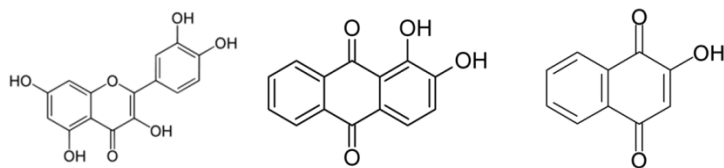
Základní idea přírodního barvení je založena na představě levného, netoxického a obnovitelného využívání přírodních zdrojů s minimálním dopadem na životní prostředí a toto téma přitahuje také stále větší pozornost vědecké komunity. Výzkum přírodních látek vede k hledání jejich využití v různých tradičních i nově objevených aplikacích.

Rozsáhlý výzkum a vývoj v této oblasti probíhá na celém světě, ale realizace těchto technologií v moderní praxi je spíše dlouhodobou perspektivou. Pravdou je, že přírodní barviva a mořidla se používají spíše jen v malém měřítku (řemeslná výroba, zájmová sdružení, tradiční barvení u přírodních národů) a jejich masové použití v moderním textilním průmyslu by bylo obtížné. Avšak vznikající množství literatury o ochraně životního prostředí a ekonomických aspektech přírodního barvení textilu ukazuje, že dopad na životní prostředí je možné minimalizovat, a že použití přírodních látek by mělo přispět k udržitelnému rozvoji v blízké budoucnosti.

Barvení přírodními barvivy sebou nese řadu problémů - jedním z nich je **omezená škála barevných odstínů**, (v seznamu odstínů převažují spektrálně nečisté odstíny hnědé, šedé a žluté²¹), a především jejich špatná reprodukovatelnost. Jedná se o látky, které nemají standardní složení. Jejich velká **variabilita** spočívá nejen v chemickém složení, ale i v kvantitativním obsahu, což souvisí s přírodními podmínkami jejich pěstování (složení půdy, výživa, sluneční svit, zavlažování), ale i s genetickou variabilitou v rámci téhož rostlinného druhu. Závažným problémem jsou samotné výrobní náklady, které jsou u přírodních barviv z přímé sklizně velmi vysoké. Důvodem je obecně velmi **nízké procento obsahu barviv** v rostlinném materiálu a logicky tak vzniká nutnost zpracovávat velké objemy biomasy k jejich izolaci, čímž dochází k produkci velkého množství odpadů.

Dalším problémem je často **nízké procento vytažení** přírodního barviva z lázně. To zvyšuje náklady na samotné barvení (k dosažení středně sytých odstínů je potřeba 10x vyšší koncentrace přírodního barviva v lázni oproti syntetickému barvivu, kde stačí použít hmotnost barviva odpovídající přibližně 1% z hmotnosti barvené tkaniny²²) a jednak musí být zbytkové barvivo a pochopitelně i pomocné látky (především anorganická mořidla - soli kovů, bez kterých se barvení přírodními barvivy prakticky neobejde a která mají sama o sobě velmi nízkou afinitu k textilním vláknům, a proto zůstávají z větší části nevyužita v barvicí lázni) - z odpadní vody odstraněny, aby byly splněny zákonné limity pro textilní odpadní vody.

Nízké vytažení z lázně (často nebývá vyšší než 10 %²²) a zároveň i nízké stálosti u většiny přírodních barviv (čestnou výjimkou je indigo z tropického indigovníku a evropského borytu²³) má na svědomí jejich struktura, která se často podobá disperzním syntetickým pigmentům určeným k barvení syntetických vláken. Většinou se jedná o malé polární molekuly, neiontové a málo rozpustné ve vodě, např. kvercetin, alizarin, lawsone - henna (obr.7) nebo hypericin či juglon. Není náhoda, že podobně jako mnoho dalších polárních přírodních látek, i velká většina přírodních barviv obsahuje ve své struktuře fenolové či hydroxylové skupiny. Jejich poloha a počet ovlivňuje jejich reaktivitu a rozpustnost a také plní funkci autochromů.



Obr.7 Kvercetin, alizarin a lawsone (henna)

2.2 Mořidla

Mořidla jsou pomocné barvířské látky, které jsou schopny tvořit komplexy s molekulami barviva, což má za následek zvýšení vytažení jinak málo afinního barviva z lázně a tím i zlepšení stálosti vybarvení – především se zlepšují mokré stálosti a někdy i stálost na světle. Moření může být aplikováno jako předmoření textilie před barvením, jako dodatečné ustalování po barvení anebo mohou být aplikována do barvicí lázně během barvení.

Rostliny mohou být kromě barviv také zdrojem mořidel, ale je třeba zdůraznit, že zvláště v případě barvení rostlinnými extrakty jsou v získaných barvicích směsích přítomny i různé formy taninů, které se zásadně podílí na výsledném vybarvení.²⁴ Hranice mezi rostlinným "barvivem" a "mořidlem" tak není zcela ostrá, protože i samotná mořidla mohou být zároveň zdrojem barevnosti vláken a také ve spojení s barvivy mohou značně ovlivňovat a posouvat konečné barevné odstíny.²³

Biomorřidlové zdroje jsou buď rostliny s vysokým obsahem taninů nebo rostliny s hyperakumulací kovů. Jedná se o různé tropické odrůdy stromů a keřů rodu *Symplocos* (samoduť), které obsahují kamenec – síran hlinitodraselný, který má adstringentní účinky a tyto dřeviny mají využití v lidovém léčitelství i v textilním barvířství.²⁵

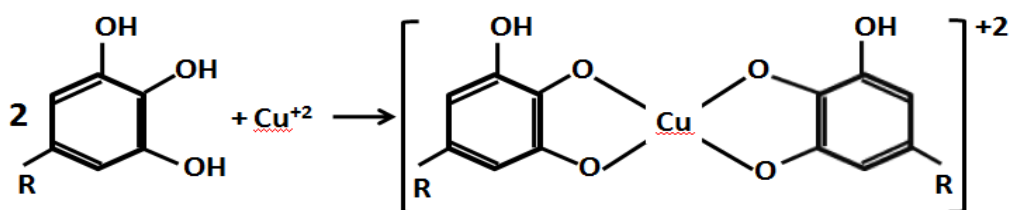
Objevují se i práce, které popisují úspěšné využití rostlinného chlorofylu jako mořidla – odstraněním centrálního atomu hořčíku z těchto komplexních pyrrolových sloučenin v kyselém prostředí získává chlorofyl volnou vaznou kapacitu a může tak fungovat jako jiná např. taninová komplexační mořidla.²⁶

Mořidla na bázi taninů

Stálosti, sytost i brilantnost odstínu přírodních barviv lze zvýšit použitím vhodného mořidla, se kterým následně barvivo vytvoří komplex, v jehož důsledku se vybarvení posouvá hyper- a bathochromně (posun k delším vlnovým délkám a k tmavším odstínům).^{23, 27}

Taniny byly jako mořidla používány stovky let, a to buď samotné, anebo v součinnosti s kovovými solemi (např. CuSO_4 , SnCl_2 , FeSO_4 , $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ aj.). Fenolové skupiny taninů mohou tvořit účinné vazby s různými typy vláken a barviv a pomoci tak při fixaci barviv. Mořidla na bázi taninu našla využití při barvení celulósových vláken, především při barvení bavlny, která má velmi nízkou afinitu k většině přírodních barviv, a to při jejím barvení bazickými (kationickými) barvivy.

Klasický způsob je dvoufázový, kdy se nejprve namoří bavlna taninem a následně se aplikují soli kovů a pak následuje barvení. Tento postup je založen na představě, že se nejprve dostane tanin do vlákna a následná aplikace kovových solí (ionty Fe, Cr, Cu, Al, Pb nebo Sn) vede ke vzniku komplexů (obr.8) in situ, což tanin na barvený materiál upevní a následně aplikované přírodní barvivo je jeho prostřednictvím vázáno k vláknu pevněji a s vyšší afinitou.



Obr.8 Vznik komplexů o-fenolových skupin s ionty kovů

Moderní využití taninů zahrnuje především použití kyseliny tříslové ke zvýšení odolnosti polyamidových koberců vůči skvrnám (polyamidy jsou v triboelektrické řadě podobně jako vlna na tzv. kladném konci a tento kladný náboj zvyšuje sklon k zašpinění tím, že převážně záporně nabitá špína je k textilií více přitahována – taniny patrně na povrchu tento kladný náboj snižují) a pro zvýšení mokrých stálostí kyselých (anionických) barviv na polyamidových textiliích, zvláště na polyamidu 6 a polyamidu 6.6.

Reakce taninů se solemi železa (především zelená skalice, $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) je známa už z dob antiky (např. příprava duběnkového inkoustu). Získávaly se tak černé, šedé, šedohnědé a modravé odstíny na vlně, bavlně i hedvábí. V kombinaci s kyselými barvivy na vlně a na polyamidu se tak sice dosahuje zlepšení mokrých stálostí, ovšem především při jednostupňovém barvení (současné použití taninu i solí kovů v jedné lázni) vznikají velké komplexní molekuly, které zůstávají pouze na povrchu vláken, což má za následek nízké stálosti v ořeru. Proto je nutná postupná aplikace taninů a solí kovů (dvoufázový proces, který barvení prodražuje), aby se zlepšila difuze do vláken a došlo k vytvoření komplexů in situ.²⁸

Původní rostlinné taninové extrakty byly v praxi nahrazeny některými komerčními taninovými přípravky – jedná se o přípravky backtan („přírodní tanin“) a syntan („syntetický tanin“).

Backtan je ustalovací přípravek vyvinutý ke zvýšení mokrých stálostí kyselých barviv na polyamidu. Tzv. full backtan proces zahrnuje barvení polyamidu kyselým barvivem při pH 2,5 po dobu 30 minut při 70 (polyamid 6) nebo 90 °C (polyamid 6.6), následuje oplach taninem (kyselinou tříslovou), dále 20 minut působení vlnanu antimonyl-draselného a nakonec důkladné praní ve vodě.²⁹

Princip tohoto postupu spočívá v tom, že tanin se chová jako vysokomolekulární kyselina, váže se (v kyselém prostředí kyseliny octové nebo mravenčí) se zprotonovanými aminoskupinami polyamidového vlákna a následnou reakcí s vlnanem vzniká povrchová vrstvička nízkorozpustného antimonyl tannátu. Přítomnost těchto komplexů na povrchu obarvených vláken brání desorpci barviva z vlákna při praní a také migraci barviva do sousedních oblastí.

Aplikace backtanu na polyamidy při barvení kyselými (anionickými) barvivy velmi vylepšuje mokré stálosti, přesto se od tohoto postupu ustoupilo z několika důvodů: vlnan antimonyl-draselný je toxický, úprava může způsobovat změny odstínu, dvoustupňový proces aplikací taninu a vlnanu zvyšuje náklady, kyselina tříslová se v zásaditém prostředí snadno oxiduje, což vede především u světlých odstínů k odbarvení textilie, úprava není stálá v páře nebo při vysoké teplotě kvůli tepelné degradaci kyseliny tříslové a navíc tato úprava způsobuje drsný omak textilie.²⁹

Syntan je označení syntetických přípravků, které byly vyvinuty původně pro vyčiňování kůží jako náhražka taninů. Následně byly na podobném základě vyvíjeny prostředky pro ustalování kyselých barviv na polyamidu a termín syntan (= syntetický tanin) už zůstal zachován. Tyto přípravky určené k vyčiňování kůží měly účinek i na ustalování kyselých barviv, ale na druhé straně syntanové přípravky pro ustalování kyselých barviv nemusely být nutně účinné pro vyčiňování kůží. Přesto se název původně koželužského přípravku vžil pro označení syntetických ustalovačů kyselých barviv pro barvení polyamidových vláken. Jejich přesné složení je většinou utajováno a chráněno patentem, nicméně HPLC analýzy odhalily velmi různorodé složení komerčních produktů. Nejčastěji jsou to anionické, ve vodě rozpustné formaldehydové kondenzáty arylsulfonátů a sulfonů.²⁸ Tanin nebo některý z komerčních přípravků na bázi taninů (Tannex) se pro předmoření textilií používá až v 30% koncentraci při poměru lázně 1:20.³⁰

Anorganická mořidla

Anorganická mořidla představují tu méně ekologickou variantu moření vláken. Jsou to soli kovů, nejčastěji sírany či chloridy železa, cínu, mědi apod. I zde lze však rozlišovat varianty s různou toxicitou a více nebo méně zatěžující životní prostředí. K tradičním anorganickým mořidlům patří **kamence**, což jsou hydratované podvojně sírany, které se běžně vyskytují v přírodě. Často je jako „kamenec“ označován dodekahydrát síranu draselno-hlinitého ($\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$). Tato látka má navíc adstringentní (svíravé) účinky, a proto se používala k zástavě krvácení při pořezání při holení, dále jako antiperspirant, adjuvans do vakcín apod. Toxicita chemické látky se vyjadřuje jako letální dávka pro určitý organismus, což je dávka, při které uhynie polovina testovaných zvířat - LD_{50} kamence je u myši, krysy a králíka udávána v hodnotě 300, 980 a 3200 mg/kg hmotnosti při perorálním podání.²⁵

Dalším mořidlem je **chlorid cínatý** (SnCl_2), což je ve vodě rozpustná anorganická látka se silně redukčními účinky. Je zdraví škodlivý (akutní toxicita vyjádřená jako LD_{50} podána orálně činí u myši 250 mg/kg, u krysy 700 mg/kg a u králíků 10 000 mg/kg³¹). U testovaných zvířat způsobuje chlorid cínatý změny krevního obrazu, demineralizaci kostí, záněty a poškození vnitřních orgánů. Přesto je v České republice i v některých zemích EU a v USA jeho používání povoleno pro potravinářské účely (označení E512). Používá se např. jako antioxidant v nápojích s oxidem uhličitým nebo při konzervaci chřestu. Jeho použití v České republice povoluje vyhláška č. 4/2008 Sb. (příloha 2).³²

Síran měďnatý (resp. jeho pentahydrát - modrá skalice, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) a **síran železnatý** (heptahydrát - zelená skalice, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) jsou velmi často používaná mořidla. Snadno tvoří koordinační komplexy s barvivem. Koordinační číslo síranu měďnatého a síranu železnatého je 4 a 6, a tak některá koordinační místa zůstávají při interakci s vláknem neobsazena. Proto funkční skupiny, jako jsou aminoskupiny nebo karboxyly barviva, mohou tato místa obsadit. To znamená, že kov nakonec může vytvořit ternární komplex, ve kterém se váže s vláknem i s barvivem. V porovnání s nimi tvoří chlorid cínatý a kamenec hlinito-draselný jen slabé komplexy. Tato mořidla mají sice tendenci tvořit silné vazby s barvivem, ale ne s vláknem, takže blokují barvivo a potlačují interakci barviva s vláknem.³³

Pro vznik koordinačně kovalentní vazby funkčních skupin barviva s kovovými ionty mořidlových solí je nutné vhodné prostorové uspořádání tak, aby se vzdálenosti vazných skupin barviva příliš nelišily od ideální vzdálenosti ligandů v krystalografické struktuře daného centrálního iontu kovu. Barviva většinou zabírají dvě nebo čtyři vazby na centrálním kovovém iontu a zbývající pozice zaujímají molekuly vody nebo reaktivní skupiny na vlákně.

Dostáváme se tak k diskutabilnímu protikladu, kdy lze dosáhnout lepší stálosti i vybarvení textilie přírodním barvivem za cenu použití kovové soli. Někteří autoři publikací věnovaných přírodnímu barvení se ve snaze zdůraznit ekologičnost a zdravotní nezávadnost přírodních barviv záměrně vyhýbají tomuto tématu a často koncentrace použitých mořidel vůbec neuvádějí.

Mořidlové soli jsou totiž běžně používány v koncentraci 5-10 g/litr i více,^{22, 34, 35, 36} např. „1-2 lžíce na 100 g vlny“³⁷, 40-60% hmotnosti barveného hedvábí (což je při poměru lázně 1:40 koncentrace mořidla 10-15 g/litr lázně), k moření bavlny je mořidlová sůl používána v množství více než 20 hmotn.%.³⁸ Jak se zdá, tato množství je možné i značně snížit při použití dalších fyzikálních metod, jako např. až na koncentraci 0.2 g/litr při současném použití plazmatu k předúpravě vlny³⁹ nebo při použití ultrazvukové barvicí lázně.²⁶

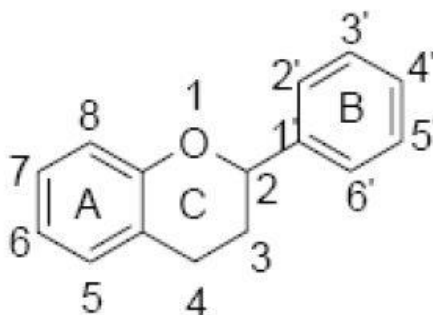
Vzhledem k tomu, že soli kovů jsou obecně zdraví škodlivé látky, je žádoucí jejich použití minimalizovat, i když jsou tyto látky na oděvu v přímém kontaktu s kůží pouze v nepatrné koncentraci.

2.3 Vybraná přírodní fenolová barviva

2.3.1 Flavonoidy

Rostlinné polyfenoly zahrnují několik tisíc látek. Podle své chemické struktury se dělí do několika skupin – čtyři základní velké skupiny jsou: flavonoidy, fenolové kyseliny, stilbeny a lignany. Z celkového množství polyfenolů, které tvoří součást naší rostlinné stravy, tvoří asi dvě třetiny flavonoidy, třetinu fenolové kyseliny a zbylé dvě skupiny se podílejí jen nepatrně.⁴⁰

Flavonoidy (bioflavonoidy) tvoří rozsáhlou skupinu přírodních látek. Chemicky se jedná o deriváty difenylpropanu nebo fenylochromanu. Mají dva substituované benzenové kruhy A a B, s kruhem A je kondenzován pyranový kruh C (obr.9). Tento pyranový kruh obsahuje trojvazný kyslík, který svým kladným nábojem umožňuje vznik oxoniových solí. Flavonoidy zahrnují asi 4000 látek, které jsou různými deriváty této struktury. Jejich klasifikace je založena na stupni oxidace pyranového C - kruhu. Hydroxylové (fenolové) OH skupiny se nejčastěji vyskytují v poloze 3', 4', 5 nebo 7.⁴¹



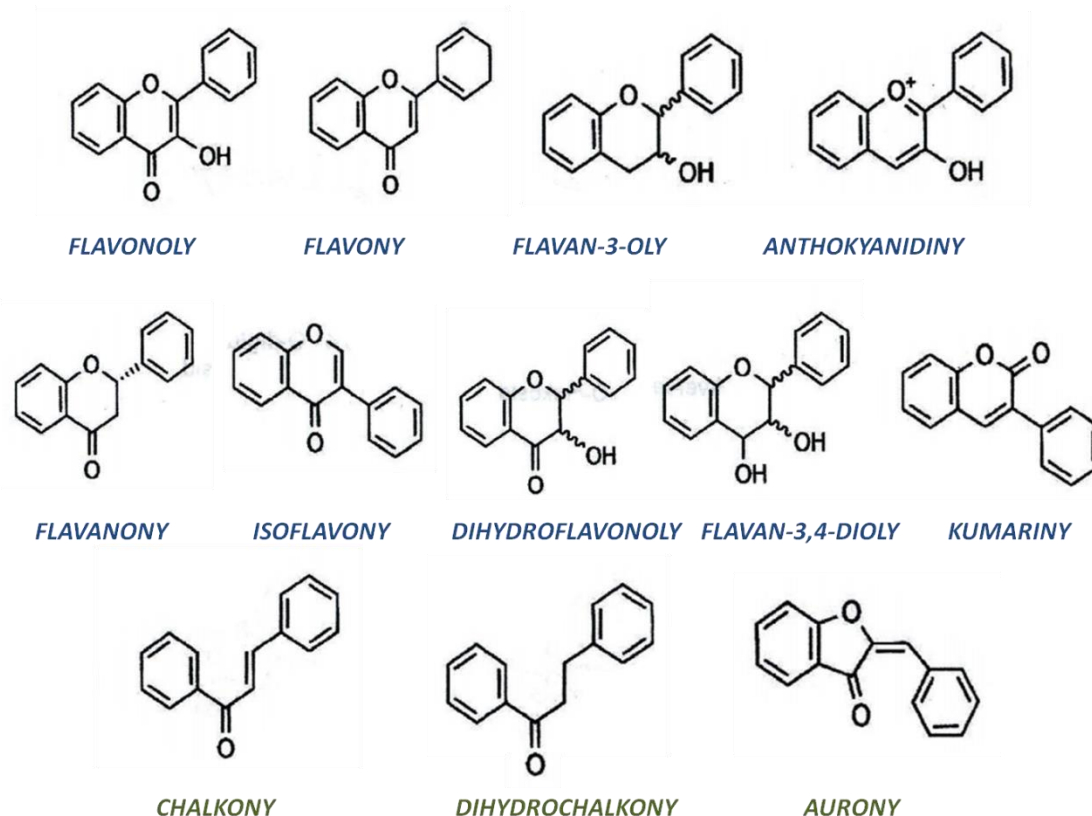
Obr.9 Základní struktura flavonoidů

V rostlinách jsou flavonoidy často vázány na různé cukry (např. glukózu nebo rhamnózu), s nimiž se váží glykosidickými vazbami, nejčastěji v poloze 3. Cukr může být acylován organickými kyselinami (např. kyselinou gallovou, benzoovou, malonovou aj.). Lze tedy říci, že jde o přírodní látky velmi různorodého uspořádání, které se liší hydroxylací, methoxylací a glykosidací. Přítomnost polárních skupin na A, B a C kruhu a na cukrech zvyšuje jejich rozpustnost ve vodě, zatímco především přítomnost methylových skupin na jádře naopak rozpustnost ve vodě snižuje.

Flavonoidy jsou obsaženy v plodech, listech a květech rostlin, často i v množstvích dosahujících stovky miligramů na kilogram.

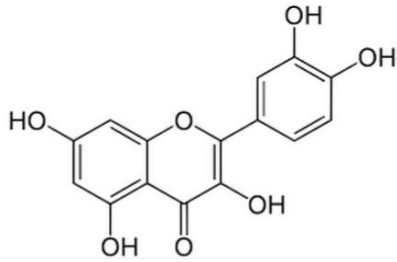
Flavonoidy mají řadu biologických účinků, především se jedná o silné antioxidanty, které jsou schopny chránit buňky před oxidačním stresem a zároveň fungují jako „zhášače“ volných radikálů, které vznikají jednak přirozeně v průběhu metabolismu buňky, jednak vlivem silících civilizačních faktorů (chemikálie, záření) a které ve svém důsledku destruuji buněčné substrukтуры a nadměrně vyčerpávají buněčné reparační mechanismy, takže vedou k předčasnému stárnutí a vzniku nejrůznějších chorob a poškození (záněty, chromozomální aberace, nádory apod.). Flavonoidy v potravě nebo potravních doplňcích tak mohou přímo či nepřímo (specifickou chemickou interakcí mohou ovlivnit redox stav buněk, cesty kináz a signálních bílkovin) napomáhat při léčbě kardiovaskulárních či neurodegenerativních chorob, při léčbě nádorů, zánětů apod.^{2, 3, 6, 9}

Podle necukerných substituentů se flavonoidy dělí dále na flavonoly, flavony, flavan-3-oly, anthokyanidiny, flavanony, isoflavony, dihydroflavonoly, flavan-3,4-dioly a kumariny, strukturně příbuznými sloučeninami jsou chalkony, dihydrochalkony a aurony (obr.10).^{41, 42}

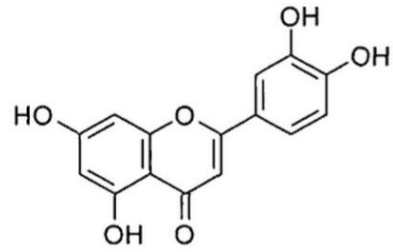


Obr.10 Rozdělení flavonoidů (podle⁴²)

V přírodě jsou nejrozšířenější flavonoly, a to v podobě O-glykosidů především v poloze 3 kruhu C. Bohatým zdrojem flavonolů jsou např. cibule, rajčata, jablka, brokolice, špenát. Nejznámějším a nejrozšířenějším flavonolem je žlutý **kvercetin** (obr.11), který má mnoho biogenních účinků (např. protizánětlivé, antioxidační, protinádorové). Je velmi špatně rozpustný ve vodě, jako lipofilní látka však velmi dobře proniká buněčnými membránami. Kvercetin se v rostlinách vyskytuje nejčastěji v podobě kvercetin 4'-O-glukosidu a 3,4'-O-diglukosidu, známý je také kvercetin-3-O-rutinosid (**rutin**), který se vyskytuje v listech pohanky.



Obr.11 Kvercetin



Obr.12 Luteolin

Zástupcem skupiny flavonů je žlutý **luteolin** (obr.12), který se v rostlinách vyskytuje opět nejčastěji jako glukosid. Najdeme ho např. v celeru, mrkvi, oreganu, pampelišce, rozmarýnu, prosu, olivovém oleji aj.⁴³ Mnohé in vivo a in vitro studie udávají jeho protizánětlivé a protinádorové účinky, podobně jako u kvercetinu.^{44, 45}

Mnohé flavonoidy jsou významné jako rostlinná barviva, především žluté flavony a flavonoly (z latinského *flavus*=žlutý) a jejich název je základem pojmenování celé skupiny. Žluté jsou i chalkony a aurony, flavanony jsou bezbarvé nebo nažloutlé a specifickou skupinou jsou červené, růžové, fialové, modré, oranžové, ale i žluté anthokyany.⁴⁶

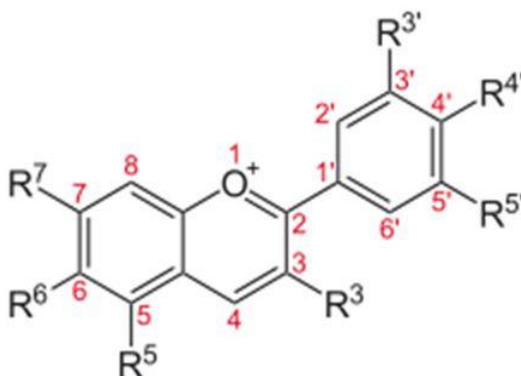
2.3.2 Anthokyany

Anthokyany jsou ve vodě rozpustné pigmenty, které jsou obsaženy v buněčných vakuolách různých rostlinných částí- v květech, plodech, listech, stoncích i podzemních částech rostlin. Jsou zodpovědné za pestrou paletu červených, fialových a modrých odstínů květin, plodů, zelenin a semen. V rostlinách plní řadu důležitých funkcí, např. barva květů a plodů láká hmyz a zvířata k opylení a roznášení semen a anthokyany jsou syntetizovány také z důvodu ochrany rostlinných pletiv před UV zářením.

Jejich typickou vlastností je změna barvy podle pH prostředí, obecně od červené v kyselém prostředí, přes purpurovou do modré v prostředí zásaditém. Anthokyany jsou vedle chlorofylů nejvýznamnější skupinou rostlinných pigmentů ze skupiny flavonoidů.

Chemická struktura anthokyanů

Základní skelet je opět tvořen kruhy A, B a pyranovým kruhem C v kondenzaci s kruhem A, substituenty v různých pozicích pak vedou ke vzniku nejrůznějších variant (obr.13). V přírodě bylo dosud identifikováno kolem 500 anthokyanů a mnohé rostliny jim vděčí za svou červenou, růžovou, purpurovou, fialovou, modrou nebo i oranžovou barvu. Počet samotných aglykonických anthokyanidinů je oproti tomu mnohem menší (udává se kolem 15⁴⁶ až 17⁴⁷, přičemž 6 z nich se vyskytuje nejčastěji: kyanidin, delfinidin, pelargonidin, malvidin, peonidin a petunidin.⁴⁸ (Tab.1).



Obr.13 Základní struktura anthokyanů

Tab.1 Nejvýznamnější anthokyanidiny

ANTHOKYANIDIN	R3'	R4'	R5'	R3	R5	R6	R7
kyanidin	- OH	- OH	- H	- OH	- OH	- H	- OH
delfinidin	- OH	- OH	- OH	- OH	- OH	- H	- OH
malvidin	-OCH ₃	- OH	- OCH ₃	- OH	- OH	- H	- OH
pelargonidin	- H	- OH	- H	- OH	- OH	- H	- OH
peonidin	- OCH ₃	- OH	- H	- OH	- OH	- H	- OH
petunidin	- OH	- OH	-OCH ₃	- OH	- OH	- H	- OH

Název anthokyanů pochází z řeckého *anthos*=květina a *kyanos*=temně modrý, ovšem jejich barevná škála je mnohem bohatší. Anthokyaniny jsou glykosidické formy anthokyanidinů – jejich cukernou složku (glykon) tvoří nejrůznější mono-, di- i trisacharidy složené z (dosud identifikovaných) pěti monosacharidů. Podle četnosti výskytu je to D-glukóza, L-rhamnóza, D-galaktóza, D-xylóza a L-arabinóza. Nejběžnějšími disacharidy jsou rutinóza, sambubióza, soforóza, laminaribióza a genciobióza. Sacharidy jsou navázány na anthokyanidiny nejčastěji v poloze 3 a 5, výjimečně v polohách 7, 3', 5' a 4'. Volný hydroxyl v poloze 3 destabilizuje anthokyanidinový chromofor a hydrolyza sacharidu v této poloze má za následek nevratnou ztrátu barvy.⁴⁶

Podle počtu navázaných sacharidů se anthokyaniny dělí na 3-monosidy (mají monosacharid navázaný v poloze 3), 3-biosidy (mají disacharid navázaný v poloze 3), 3-triosidy (mají lineární nebo rozvětvený trisacharid navázaný v poloze 3), 3,5-diglykosidy (mají monosacharidy navázané v polohách 3 a 5), 3,7-diglykosidy (mají monosacharidy v polohách 3 a 7) a 3-biosidy-5-monosidy (mají disacharid v poloze 3, monosacharid v poloze 5). Nejčastěji se v rostlinách vyskytují kyanidin-3-glykosidy.⁴⁶

Cukerná část může být acylovaná kyselinou kumarovou, kávovou, ferulovou, sinapovou, hydroxybenzoovou, jablečnou, šťavelovou, maleinovou, jantarovou nebo octovou. Acylovány jsou v převážné většině 3-glykosidy. Druh cukru však nemá velký vliv na chemické vlastnosti barviv, mnohem významnější je poloha, ve které je cukr vázán. Nicméně acylace anthokyaniny stabilizuje, takže reakcí s vodou ve slabě kyselém nebo neutrálním prostředí nevzniká bezbarvá karbinolová pseudobáze, tyto pigmenty jsou méně citlivé na změnu pH a ve slabě kyselém a neutrálním prostředí zůstávají barevné.⁴⁹

Druh anthokyanidinu obsaženého v rostlině do značné míry určuje její barvu: červenooranžovou vytváří především obsah pelargonidinu, červenou pelargonidin s kyanidem, fialovou kyanidin s delphinidem, modrou obvykle vyvolávají deriváty delphinidinu a chelátové komplexy kyanidinu s kovy, hnědou barvu mají sloučeniny kyanidinu s rutinem.⁵⁰

Barvu anthokyanů ovlivňují hydroxy- a methoxysubstituenty: obecně platí, že větší množství hydroxylových substituentů posouvá barvu k modřejším odstínům, naproti tomu methoxyskupiny spíše k červeným. Glykosidy a jejich acylderiváty mají obecně modré zbarvení. Také lze obecně říci, že větší počet hydroxyskupin mají méně stabilní anthokyanidiny, s rostoucím počtem methoxyskupin se stabilita zvyšuje.⁴⁹

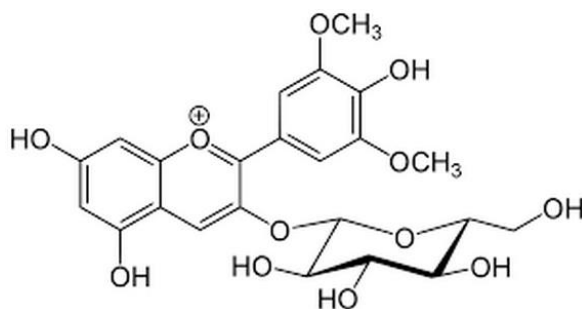
Mnoho rostlin obsahuje kromě anthokyanů i další barviva jako kvercetin, chlorofyly nebo karotenoidy, které ovlivňují výslednou barvu rostliny. Spolu s anthokyaniny se v rostlinách vyskytují flavony a účastní se na barvě jako kopigmenty. Tento kopigmentační mechanismus je jedinečný právě pro anthokyaniny. Kromě flavonoidů reagují anthokyaniny slabými vazbami také s alkaloidy, aminokyselinami, řadou fenolových kyselin a s kyselinou askorbovou aj., tento jev se nazývá **intermolekulární kopigmentace**. Silnější je tzv. **intramolekulární kopigmentace**, při které reagují acyly acylovaných anthokyanů s jejich aglykonem a takto je flavyliový kationt chráněn před nukleofilním útokem molekul vody. Další významný vliv na výslednou barevnost má asociační mechanismus molekul anthokyanů a dokonce tvorba komplexů s kovovými ionty přítomnými v rostlině.⁵¹

Výskyt anthokyanů

Anthokyany jsou obsaženy např. v rostlinách čeledi révovité (vinná réva), růžovité (třešně, švestky, višně, maliny, jahody, ostružiny, aronie, jablka, hrušky), lilkovité (lilek, brambory s červenou slupkou), lomikamenovité (černý a červený rybíz, červený angrešt), vřesovcovité (borůvka, brusinka), brukvovité (červené zelí, ředkvičky, červený kedluben), slézovité (ibišek), routovité (červené odrůdy pomerančů a grapefruitů), lipnicovité (červené odrůdy kukuřice), aj.

V přírodě se nejčastěji vyskytují glykosidy kyanidinu (podle latinského názvu chrpy, *Cyanus*, fialový), delfinidinu (podle názvu stračky, *Delphinium*, purpurově modrý), malvidinu (podle slézu, *Malva*, purpurový), pelargonidinu (dle pelargonie, *Pelargonium*, šarlatově červený), peonidinu (podle pivoňky, *Paeonia*, fialový) a petunidinu (podle petunie, *Petunia*, purpurově modrý). Samotné volné aglykony se vyskytují v rostlinách vzácně jen jako stopová množství produktů rozkladu anthokyanů.

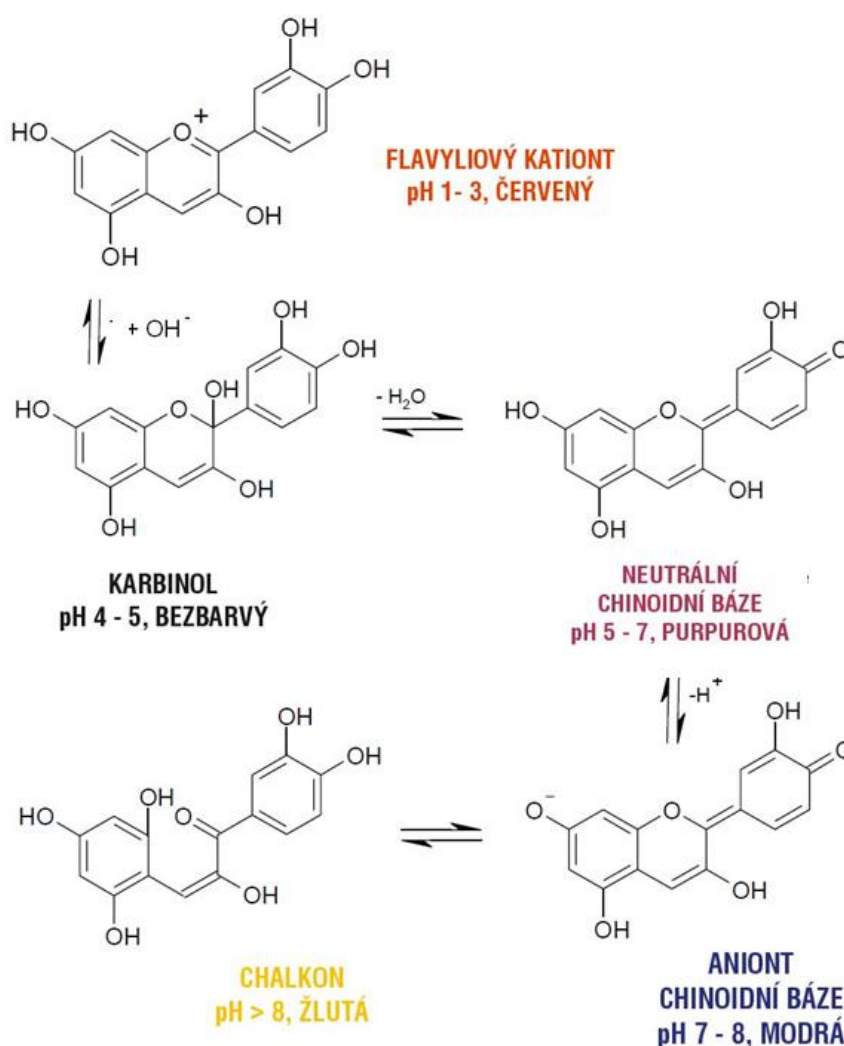
Některé rostliny obsahují anthokyany odvozené od jediného anthokyanidinu (např. jablka, červené zelí a černý bez obsahují glykosidy kyanidinu), jiné obsahují různé glykosidy více druhů anthokyanidinů (černý rybíz obsahuje deriváty kyanidinu a delfinidinu, jahody obsahují deriváty pelargonidinu a kyanidinu, borůvky obsahují deriváty kyanidinu, malvidinu, petunidinu a delfinidinu, ostružiny obsahují deriváty kyanidinu a malvidinu, hrozny modré vinné révy deriváty malvidinu (obr.14) a v menší míře petunidinu, peonidinu, delfinidinu, kyanidinu a pelargonidinu, atd.).^{46, 50, 52}



Obr.14 Anthokyan oenin obsažený ve víně (=malvidin-3-O-glukosid)

Barevné změny v závislosti na pH

Jak již bylo zmíněno, typickou vlastností anthokyanů je změna jejich barvy v závislosti na pH prostředí. Dochází k postupné přeměně na 5 různých struktur aglykonů: v silně kyselém prostředí existují výhradně v podobě červených flavyliových kationtů (solí), respektive pyranový C-kruh anthokyanové struktury se mění na pyryliový kationt. Při rostoucím pH postupně vzniká a stabilizuje se bezbarvá karbinolová pseudobáze, červená barva slábne a při pH kolem 4 – 4.5 dochází k úplnému odbarvení. Tohoto výrazného rozdílu je využíváno při měření degradačního indexu nebo při stanovení množství anthokyanů dle Giustiové a Wrolstada.⁵³



Obr.15 Strukturální změny anthokyanidinů v různém pH⁵⁴

Dalším růstem pH vzniká neutrální chinoidní báze, která sebou nese purpurově fialové zbarvení. Při pH 7 - 8 vzniká její modře zbarvený aniont. S dalším zvyšováním alkality se postupně vytrácí modré zbarvení, dochází k otevření pyranového kruhu a vznikají žluté chalkony (obr.15).

Tyto změny neprobíhají jen in vitro, různě kyselém prostředí v rostlinách má stejný účinek a rozhoduje o tom, zda je anthokyan v rostlině přítomen v modré aniontové podobě nebo spíše v jasně červeném kationtovém stavu flavyliové soli. Kromě typu anthokyanidinu, který je

primárně příčinou určitého zbarvení a pH, které má rostlina nastaveno, vstupuje do procesu i již popisovaná glykosylace, acylace, intermolekulární a intramolekulární kopigmentace a chelatace s ionty kovů, a to vše ovlivňuje výslednou barvu květů, plodů a dalších částí rostliny.

Tak bylo např. v roce 1966 objeveno, že v modré chrpě je přítomen kyanidin derivovaný vysokomolekulárním polysacharidem v anionické podobě vázaný v komplexu s Al^{+3} a Fe^{+3} ionty.⁵⁵ Novější výzkum na základě rentgenové analýzy krystalové struktury pigmentu chrpy upřesnil, že je tvořen z komplexu 6 molekul, z nichž každá obsahuje běžný kyanidin a flavon s jedním Fe^{+3} iontem, jedním Mg^{+2} a dvěma Ca^{+2} ionty a tento tetrametalový komplex je oním zdrojem chrpové modři.⁵⁶

Dalším hezkým příkladem, jak se může měnit barevnost květu v závislosti na vazbě anthokyanu s kovovými ionty, jsou hortenzie. U nich souvisí změna barvy květů s pH půdy a také obsahem hliníku. Kyselější půda totiž umožňuje vyšší příjem Al^{+3} z půdy a tento komplex s anthokyanem ve vakuolách mění růžovou barvu hortenzie na modrou. Této barevné změny lze dokonce dosáhnout rychleji při aplikaci hlinitých solí v roztoku přímo na listy nebo květy hortenzie.⁵⁷

Také glykosylace a vazba s organickými kyselinami může značně ovlivnit barvu anthokyanových pigmentů. Např. bylo dosaženo modré barvy u synteticky připraveného pigmentu hortenzie, který byl kopigmentem delfinidin 3-glukosidu s 5-O- kyselinou kafeoylchinovou, 5-O-p-kumaroylchinovou a s ionty Al^{+3} . Autoři dokázali, že přítomnost 1-COOH, 1-OH a 5-O-esteru kyseliny chinové jsou nutné pro vznik modré barvy.⁵⁸

Detailní popis mechanismu barevných přeměn anthokyanů v závislosti na změnách v jejich chemické struktuře v různě kyselém prostředí je převzat z⁵⁴:

V kyselém prostředí, tedy prostředí s přebytkem H^+ iontů, je chinon těmito ionty atakován a dochází k jeho změně na alkoholovou skupinu. Elektronově nejchudší místo v celém systému je díky elektronegativitě pyranového kyslíku v sousedství tohoto kyslíku na uhlíku C2, a tak OH^- ionty z vodného roztoku směřují sem- dojde vlastně k adici vody a vzniká velmi nestabilní karbinolová pseudobáze. Konjugovaný systém dvojných vazeb je zcela přerušeno, dochází ke ztrátě barevnosti. (Při reálném měření anthokyanu však často jen k poklesu než k úplné ztrátě barevnosti). Dalším působením H^+ iontů (tedy snižováním pH) dojde k odnětí této naadované OH^- skupiny (jde o nestabilní místo, terciární alkoholovou skupinu, která se snadno odštěpí). Pyranový kyslík v C kruhu poskytne jeden svůj nevazebný elektronový pár do vazby s tímto sousedním uhlíkem, proto je v tomto stavu na pyranovém kyslíku lokalizován kladný náboj, vzniká tedy O^+ . Kladný náboj pyranového kyslíku je kompenzován interakcí s jeho dalším nevazebným elektronovým párem a tím je propojen konjugovaný systém kruhů A, B i C, dochází k silnému nárůstu absorpance a hypsochromnímu posunu (stav stabilního jasně červeného flavyliového kationtu).

V zásaditém prostředí, tj. prostředí s nedostatkem H^+ iontů, OH^- skupiny vzniklé disociací vody atakují nejkyselější vodík aglykonu, což je vodík OH^- skupiny nejdál od chinonu (v poloze C7 v A cyklu flavanu) a vznikne fenolát (aniont chinoidní báze). Konjugovaný systém zůstává zachován, absorpance se opět zvýší, dochází k bathochromnímu posunu. Tento přechod je vlivem dalších substituentů u jednotlivých anthokyanů různý, např. u červeného zelí dochází ke vzniku modrého fenolátu mnohem dříve (už při velmi mírně zásaditém pH) než u černého bezu, jehož anthokyanový vodný roztok zůstává červený ještě i v silně zásaditém prostředí (pH 11).

K oxidativnímu rozkladu na žlutý chalkon začne docházet až při velmi vysokém pH, chinon se přemění na karbinol, dochází k rozštěpení celého systému v jeho nejslabším místě, konjugovaný systém zaniká, ztrácí se původní barevnost. Vzniklá struktura je dost stabilní a

návrat k původním konjugovaným strukturám je již obtížný, i když částečně tato konverze probíhá. Chalkon se rozštěpením pyranového kruhu neodbarví zcela, protože ve zbylých dvou izolovaných aromatických kruzích je zachována konjugace dvojných vazeb. Vybudit tyto elektrony absorbovanými fotony už je ale obtížnější a zvládnou to jen fotony s vyšší energií, tj. v UV oblasti světla a do viditelné oblasti se promítnou jen okraje velmi intenzivních UV absorpčních pásů, které vyvolávají žluté zbarvení.

Přechody červených flavyliových solí ve fialové chinoidní báze a jejich modré anionty jsou při změnách pH velmi rychlé a vratné, transformace chalkonu je však pomalá a neprobíhá již kvantitativně.

Tepelná a světelná stabilita anthokyanů

Anthokyaniny hrají velmi důležitou roli v **potravinářství**. Brilantních odstínů flavyliových solí, silné barvicí schopnosti a relativní zdravotní nezávadnosti anthokyanů se využívá v potravinářství k dobarvování potravin (mléčné výrobky, nápoje, cukrovinky aj.). U nás je jejich používání zakázáno pouze v dětské výživě. K tomuto účelu se používají nejčastěji výtažky z černého bezu, z černého rybízu, višně, ze slupek tmavých hroznů, ze zelí, a to v kyselém prostředí (nejčastěji kyseliny citronové) při pH 3-4.5, kdy jsou nejstabilnější. Při nižším pH probíhá především hydrolyza glykosidické vazby, při vyšším pH (již při pH>5) začíná docházet k jejich oxidaci a v zásaditém prostředí se anthokyaniny rozkládají.

Ke sledování a hodnocení kvality produktů s obsahem anthokyanů se v potravinářství dříve používal tzv. **degradační index** (DI) anthokyanů.⁵⁹ Pomocí něj lze posoudit stupeň rozložení anthokyanů během zpracování a skladování různých rostlinných produktů, např. extraktů, džusů, kompotů apod. Čerstvé šťávy, které obsahují anthokyaniny, mají degradační index okolo 1.0, při hodnotách 6-7 jsou už šťávy výrazně hnědé. Podstatou metody je proměření absorbance roztoků při pH 1 a pH 4.5 v absorpčním maximu 510 až 530 nm a degradační index se počítá podle vzorce (1):

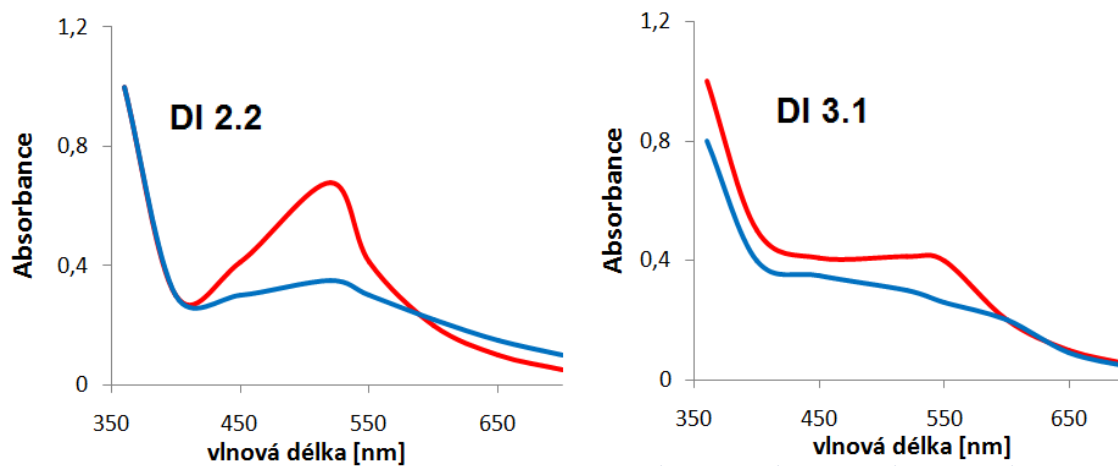
$$DI = \left(\frac{A_{1.0}}{A_{1.0} - A_{4.5}} \right) \quad (1)$$

$A_{1.0}$ absorbance při pH 1.0

$A_{4.5}$ absorbance při pH 4.5

Experimentálně zjišťovaná degradace různých anthokyanů přinesla především poznatek, že odolnost různých anthokyanů vůči teplu a světlu se značně liší. Např. anthokyaniny v červeném zelí a ve vinné révě byly vůči tepelné degradaci nejodolnější, anthokyaniny v borůvkách a černém bezu degradovaly mnohem rychleji, značný úbytek anthokyanů byl zaznamenán i u borůvkové šťávy, která byla ponechána delší dobu rozmražená. Zajímavé bylo i porovnání degradačních indexů dvou višňových kompotů: 1 rok starý produkt vykazoval DI 2.2 (obr.16) a naproti tomu už vsutku „archivní“ (více než 35 let starý) višňový kompot, který si díky skladování v dokonalé tmě a stabilní nízké teplotě kvalitního sklepa uchoval ještě neuvěřitelný DI 3.15 (obr.17) a také sensoricky se jevil být stále v přijatelné jakosti.⁵⁴ To svědčí mj. o protektivním vlivu organických kyselin, které jsou součástí anthokyanových kopolymerů.

Všechna provedená měření prokázala na jedné straně nestabilitu v zásaditém prostředí a značnou citlivost na vyšší teploty, na druhé straně je možné kyselé roztoky anthokyanů uchovávat ve tmě a chladu s omezením přístupu vzduchu po velmi dlouhou dobu v dobrém stavu (zavařeniny, víno).



Obr.16 a 17 Degradční indexy 1 rok a 35 let starých višňových kompotů⁵⁴

Podle evropských směrnic pro používání potravinářských barviv (94/36/EC a 95/45/EC) mají tato barviva označení **E163** a pro potravinářské účely mohou být extrahována vodou s oxidem siřičitým, ethanolom, methanolem, okyselenou vodou nebo oxidem uhličitým, mohou obsahovat nedefinovaný podíl organických kyselin, taninů, cukrů a minerálů a určitá definovaná množství dalších příměsí (methanol, ethanol, těžké kovy).⁶⁰

Silný zájem o anthokyaniny je vyvolán poptávkou po zdravějších potravinářských výrobcích. Pochopitelná je i snaha nahradit syntetická barviva přírodními a anthokyaniny jsou v tomto významným kandidátem. Bohužel jejich nestabilita v pH, nestabilita na světle i tepelná degradace jsou pro tyto účely značně limitující.⁵⁴

Bylo také prokázáno, že nestabilita anthokyanů má přímou souvislost s počtem hydroxylových skupin v molekule a souvisí i s počtem methoxyskupin. Na tuto stabilitu má vliv také glykosylace – diglukosidy jsou stabilnější než monoglukosidy, ovšem diglukosidy jsou zase náchylnější k neenzymatickému hnědnutí. Dále bylo prokázáno, že glykosylace nebo acylace v poloze C-5 významně přispívá ke stabilitě anthokyanu na světle. Pokles odolnosti proti světle byl pozorován v tomto sledu: acylované diglukosidy > neacylované diglukosidy > monoglukosidy.⁶¹

Acylované molekuly jsou obecně odolnější proti hydrolytické degradaci při vyšším pH a zároveň vykazují vyšší odolnost proti teplu, světle a působení SO₂, a proto se velké množství studií zabývá výzkumem a hledáním nových a odolných acylovaných anthokyanů.^{62, 63, 64}

2.4 Betalainy

Červená řepa (*Beta vulgaris*) je zemědělská plodina původem ze Středomoří, která se k nám rozšířila již v době antického Říma. Její kořen se používá do salátů i polévek (boršč), mladou nať lze konzumovat anebo se používá jako krmivo pro zvířata. Surové řepné šťávy jsou připisovány mnohé léčivé účinky. Řepa je bohatá na obsah minerálů (železo, měď), proto byla používána proti chudokrevnosti. V lidovém léčitelství se řepa používá k léčbě chorob jater a ledvin⁶⁵, v Mexiku se nálev z listů bougainvilley, která obsahuje podobná barviva jako řepa, smíchaný s medem používá k léčbě kašle⁵¹ a na Balkáně byla červená řepa dokonce používána k léčbě rakoviny.⁵⁰

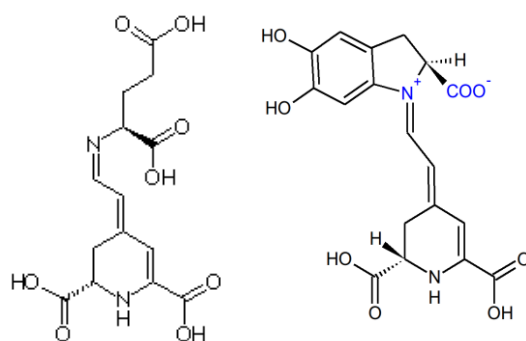
Barviva obsažená v řepě (**betalainy**) se hojně využívají v potravinářství k dobarvování potravin pod označením **E162**. Toto barvivo je navenek podobné anthokyanům⁶⁶, oba typy pigmentů jsou rozpustné ve vodě a mají silné antioxidační účinky.⁶⁷ Na rozdíl od anthokyanů jsou však řepné pigmenty barevně stabilnější v různě kyselém prostředí⁶⁸, ale mnohem méně stabilní na světle. V tab.2 je přehled několika jednoduchých chemických testů pro rozlišení anthokyanů a červenofialových betalainů (betakyanů).⁶⁹

Tab.2 Rozlišovací chemické testy pro anthokyany a betakyany (podle ⁶⁹)

Test	Anthokyany	Betakyany
alkalické pH	změna barvy na zelenou nebo pomalu žlutne	změna barvy na fialovou nebo rychle žlutne
znovu okyselení po 1 minutě	rychlé obnovení původní barvy	červená barva se neobnoví
neutrální pH	vyblednutí barvy	zůstává červenofialová barva
kyselé pH	jasně světle červená barva	prohloubení fialovočervené barvy
octan olovnatý	změna na modrou barvu	vínově červená

Podobně jako další přírodní barviva i betalainy se vyskytují v rostlinách v podobě glykosidů, nejčastější jsou 5-O-glykosidy. Jejich aglykony jsou deriváty heterocyklického indolu a jsou obsaženy nejen v červené řepě, ale i v mangoldu⁷⁰, laskavci⁷¹, opuncii^{72, 73} nebo v některých okrasných rostlinách (např. nocenka, bougainvillea⁶⁶). Betakyany jsou obsaženy také v plodech líčidla amerického (*Phytolacca americana*)⁷⁴, což je rostlina původem ze severní Ameriky, v Evropě se pěstuje jako okrasná rostlina. Plody líčidla používali už původní Indiáni v oblasti Virginie k barvení kožešin, kůže nebo proutěných výrobků, Evropané je pak záhy po objevení Ameriky začali používat k dobarvování potravin a především k pančování vína. Jsou dochované záznamy o tom, že v Portugalsku se víno obarvovalo šťávou z těchto plodů tolik, že tím utrpěla jeho kvalita, a tak bylo nařízeno, aby rostliny líčidla, které se mezitím začaly v jižní Evropě pěstovat, byly ještě před dozráním plodů zničeny a v 17. století ve Francii za Ludvíka XIV. se dokonce přidávání šťávy z líčidla do vína trestalo smrtí.^{50, 75}

Betalainy se vyskytují v rostlinách v podobě žlutých až žlutooranžových **betaxanthinů** (např. v červené řepě je obsažen vulgaxanthin, obr.18, z opuncie byl izolován indicaxanthin, betaxanthin musca-aurin byl objeven dokonce i v muchomůrkách⁷⁶) a červenofialových **betakyaninů** (např. v červené řepě je obsažen bethanidin - obr.19, a isobethanidin, v líčidle je přítomen phytolaccanin, v laskavci amaranthin, v bougainvilleích bougainvillein R a V).^{50, 77}



Obr.18 Vulgaxanthin Obr.19 Betanidin

Žlutavé betaxanthiny silně absorbují vlnovou délku v rozsahu 470–486 nm, červenofialové betakyany mají toto maximum posunuté do oblasti kolem 540 nm. Obě tyto skupiny barviv mají podobnou metabolickou cestu vzniku, jejich prekurzorem je světle žlutá kyselina betalamová.⁷⁸ Betalamové kyseliny se váží s nejrůznějšími aminokyselinami nebo aminy a tak byl např. z plodů opuncie izolován indicaxanthin se zbytkem aminokyseliny prolinu nebo z řepy izolovaný vulgaxanthin obsahoval navázaný zbytek kyseliny glutamové. Uvádí se, že betalamové kyseliny se mohou teoreticky vázat s více než 200 známými rostlinnými aminokyselinami, a proto jsou strukturní vzorce „čistých“ betaxanthinů vlastně jen hypotetické.⁷⁹ Nicméně uvádí se, že je známo více než 50 typů betalainů.⁵¹

Stabilita betalainů

Extrakce, čištění, koncentrování a následné operace, kterými musí ve výrobním procesu přírodní barviva projít, kladou vysoké nároky na jejich stabilitu. Vzhledem k vysokému obsahu betalainů v červené řepě (uvádí se množství kolem 130 mg na 100 g čerstvé váhy)^{80, 81} a jejich zdravotní nezávadnosti, je velká snaha tato barviva používat v potravinářství místo barviv syntetických, ovšem jejich nízká odolnost vůči teplotě a světlu je velkým problémem. Řepný extrakt se sice používá k dobarvování potravin, ale pro nízkou světlostálost jen pro potraviny mražené nebo před světlem dostatečně obalem chráněné.

Přirozené pH betalainů leží mezi 3.5 a 7, což je také rozmezí u běžných potravin. Udává se, že stabilita betalainů je závislá na pH, např. řepný betanin vykazuje maximální stabilitu při pH 5.5, vulgaxanthin mezi pH 5.0 až 6.0.⁸²

Také teplota má značný vliv na stabilitu betalainů. Betanin zahříváním degraduje, červená barva se ztrácí a mění se na světle hnědou.⁸³ Také světelná degradace betalainů závisí na pH, např. světlostálost betalainů při pH 3.0 je vyšší než při pH 5.0.⁸⁰

Už tedy samotná extrakce betalainů je celkem obtížná, vzhledem k tomu, že velmi snadno degradují. Především u betakyanů dochází k rychlé deacylaci, nicméně zájem o tato barviva stále roste a proto lze očekávat, že v budoucnu bude předmětem intenzivního výzkumu nejen další optimalizace podmínek pro jejich extrakci a výrobní procesy, ale především vývoj zemědělských plodin s vylepšenými vlastnostmi. Vyšší produktivita těchto plodin a vyšší obsah biosynteticky modifikovaných pigmentů s novými vlastnostmi- to jsou výzvy pro genetické inženýrství.

2.5 Analytické metody

2.5.1 Analýza rostlinných polyfenolů

Polyfenoly, podobně jako řada dalších rostlinných látek, se izolují z rostlinného materiálu různými extrakčními metodami. Univerzální postup pro izolaci všech polyfenolů neexistuje, neboť jde o látky různě polární a tedy i různě rozpustné v polárních a nepolárních rozpouštědlech. Přítomnost polárních substituentů (hydroxyly, methoxyly, karboxyly) je příčinou dobré rozpustnosti řady polyfenolů ve vodě a v dalších polárních rozpouštědlech. Často se extrakce těchto látek provádí s použitím okyseleného methanolu nebo směsí vody a ethanolu.

Rostlinné polyfenoly lze extrahovat z čerstvých, mražených nebo lyofilizovaných rostlinných materiálů. Sušení se nedoporučuje kvůli možnému snížení výtěžku extrakce a rozkladným procesům vlivem vyšší teploty. Před samotnou extrakcí se provádí homogenizace rostlinného materiálu, protože je nutné rozrušit rostlinná pletiva a pojivovou hmotu, která by mohla bránit difuzi extrahovaných látek. Provádí se homogenizace fyzikální, kam kromě různého mechanického rozdrobení a drcení spadá i mražení, protože v teplotách pod bodem mrazu vznikají v buňkách krystalky ledu, které naruší celistvost buněk a po rozmražení usnadní extrakci.

Chemická homogenizace spočívá v použití enzymů (pektinázy a celulázy) k rozrušení buněčných stěn a mezibuněčných pojiv, která jsou tvořena hlavně celulózou. Např. flavonoidy se nejčastěji extrahují pomocí vody i organických rozpouštědel (methanol, ethanol, aceton), s následnou extrakcí organickými lipofilními rozpouštědly (hexan, benzen, chloroform, dietyléter), aglykony se oddělují kyselou hydrolyzou. Moderní extrakční metodou je extrakce nadkritickou tekutinou (SFE, supercritical fluid extraction), nejčastěji nadkritickým CO₂. Výhodou této metody je minimalizace použití organických rozpouštědel a také relativně krátká doba trvání jednotlivých extrakcí.⁸⁴

K analýze anthokyanů je používána celá řada **separačních technik**. K jednodušším starším metodám patří např. **papírová chromatografie** (PC, paper chromatography), která používá jako stacionární fázi chromatografický papír, dále chromatografie na tenké vrstvě (TLC, thin layer chromatography), kde je jako stacionární fáze používán např. silikagel, celulóza nebo polyamid. Detekce je prováděna spektrofotometrickou nebo denzitometrickou analýzou barevných komplexů, které vznikly reakcí separovaných analytů s vhodnými detekčními činidly. Chromatografie na tenké vrstvě je metoda časově i finančně nenáročná, nevýhodou však je malá výtěžnost a omezená možnost kvantifikace.

V současnosti je zřejmě nejčastěji používanou analytickou metodou pro identifikaci a kvantifikaci látek vysokotlaká **kapalinová chromatografie** (HPLC) s reverzní fází. Jedná se o vysokotlakou a vysokorychlostní chromatografickou metodu, při které jsou používány kolony o délce 10 cm až 1 metr s vnitřním průměrem od 0,2 do 5 mm. Stacionární fázi představuje povrchově porézní sorbent uvnitř kolony (např. silikagel) s velikostí částic 3-5 μm, na které jsou chemicky vázané stacionární nepolární skupiny pro reverzní fázi (nejčastěji oktadecyl C₁₈H₃₇). Mobilní fáze se skládá z polární i nepolární části, vodná fáze obsahuje často přídavek organických kyselin, např. kyseliny octové, v nepolární části jsou používána různá organická rozpouštědla (metanol, propanol, butanol, etylacetát a další). Chromatografické chování polyfenolů na koloně s reverzní fází je určeno celkovou polaritou a stereochemií sloučeniny. Jednotlivé frakce jsou při HPLC detekovány buď pomocí optických, hmotnostních nebo elektrochemických detektorů.

Vysoce účinnou a přitom poměrně rychlou a levnou starší metodou, která se v sofistikovaných provedeních opět častěji objevuje v analytických metodách, je **kapilární zónová elektroforéza**⁸⁵ (CZE, capillary zone electrophoresis), při které se k separaci používá

krátká křemenná kapilára s průměrem od 50 do 100 μm . Objem analyzovaného vzorku je velmi nízký, aby nedošlo k zahlcení kapiláry. Separaci ovlivňují kromě parametrů kapiláry také nosné elektrolyty a jejich pH - flavonoidy mají v alkalickém prostředí záporný náboj. K dělení látek je využívána odlišná pohyblivost molekul (iontů) s elektrickým nábojem ve stejnosměrném elektrickém poli, dále se zde uplatňuje také elektroosmotický tok separačního pufru. Elektroosmotický tok je spontánní tok kapaliny v kapiláře, ke kterému dochází v důsledku záporného náboje na vnitřní stěně kapiláry. Separované látky s různým elektrickým nábojem jsou unášeny různými elektroforetickými rychlostmi až k detektoru.

Pro běžné stanovení flavonoidů lze také používat jednoduché spektrofotometrické metody založené na vzniku barevného chelátového komplexu flavonoid + ionty kovů, například hliníku, železa nebo mědi.^{86, 87}

2.5.2 Analýza anthokyanů

K identifikaci jednotlivých typů anthokyanů (a to jednak při běžné laboratorní analýze, tak i v podobě detektorů HPLC, obr.20) se nejčastěji používá **UV/VIS spektrofotometrie**. Většina anthokyanů vykazuje dva hlavní absorpční pásy- jeden v rozmezí 250-270 nm (absorpce záření aromatickým A-kruhem) a druhý v rozmezí 520-560 nm (absorpce záření aromatickým B-kruhem).⁵¹ Spektrofotometricky je možné také detekovat glykosylaci B-kruhu, protože spektrum vykazuje hypsochromní posun ve srovnání s neglykosylovaným B-kruhem. Touto metodou lze identifikovat také acylované anthokyaniny, protože v přítomnosti AlCl_3 je pozorován bathochromní posun pouze u anthokyanů, které nemají acylovány 3' a 5' OH skupiny.⁸⁸

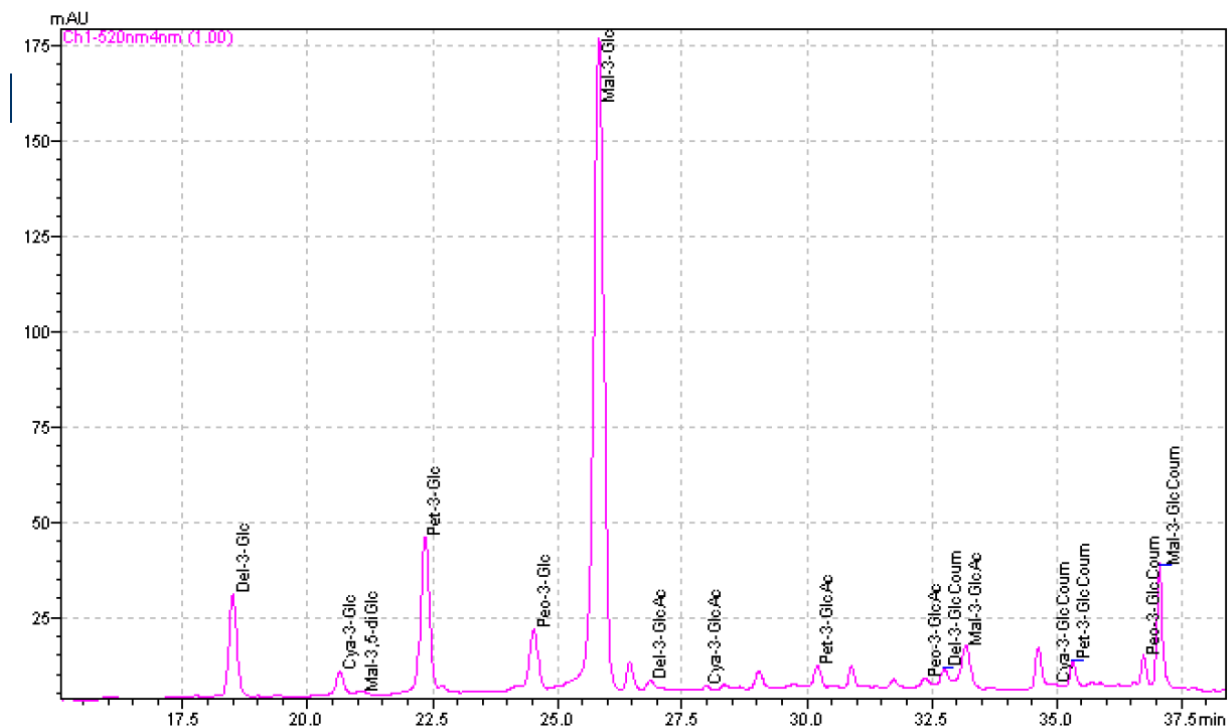
Základní charakteristikou anthokyanů je typický výrazný absorpční pík v oblasti 510-560 nm, který se objevuje v silně kyselém prostředí. Typická absorpční maxima pro některé anthokyaniny a jejich deriváty rozpuštěné v okyseleném ethanolu nebo methanolu jsou uvedena v tab.3.⁵⁰

Tab.3 Typická absorpční maxima některých anthokyanů v přítomnosti okyseleného ethanolu nebo methanolu⁵⁰

Anthokyan	Prostředí (ethanol/methanol)	Vlnová délka λ_{max} [nm]
Pelargonidin	ethanol	530
Pelargonidin 3-glukosid (<i>Callistephin</i>)	ethanol	515
Kyanidin	methanol	535
Kyanidin 3-glukosid (<i>Chrysantemin</i>)	methanol	525
Kyanidin 3-rhamnoglukosid (<i>Sambucin</i>)	ethanol	532
Delfinidin	methanol	544
Delfinidin 3-glukosid (<i>Myrtillin</i>)	methanol	535

Na principu měření barevných změn pomocí spektrofotometrie byly vypracovány další metody kvantitativní i kvalitativní analýzy anthokyanů a proanthokyanidinů – kondenzovaných taninů. Např. zkouška s okyseleným butanolem (**acid - butanol assay**) je založena na oxidativní depolymeraci kondenzovaných taninů v kyselém prostředí, při které

dochází k rozpojení kovalentních vazeb flavanolových monomerů především mezi uhlíky C4 a C8, případně k hydrolyze stabilnější vazby mezi uhlíky C4 a C6, což se projevuje nárůstem absorbance v maximu specifickém pro jednotlivé typy anthokyanidinů (např. kyanidinu nebo delphinidinu při vlnové délce 545, respektive 557 nm).⁸⁹



Obr.20 Ukázka chromatogramu vína s UV/VIS detektorem (520 nm)⁹⁰

Ke kvantifikaci fenolových skupin s použitím vhodného kalibračního standardu je používán například test na vznik pruské modři (**Prussian blue assay**)⁹¹, který je založen na redukčních vlastnostech polyfenolů. Reakcí hexakynoželezitých iontů s polyfenolem vznikají ionty hexakynoželeznaté (a oxidovaný polyfenol) (2), které po přidání železitých iontů vytvoří pruskou modř (hexakynoželeznatan železitý) (3), jejíž intenzita odpovídá množství fenolových skupin a která je měřena spektrofotometricky.



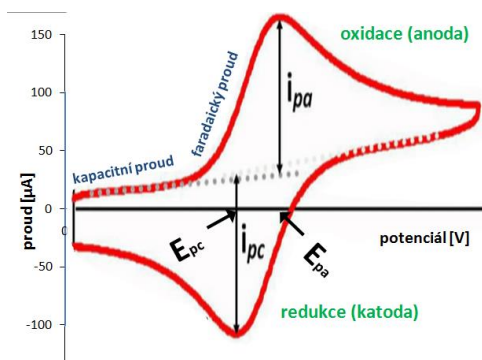
2.5.3 Cyklická voltametrie

Cyklická voltametrie je elektroanalytická instrumentální metoda, která umožňuje kvantitativní a kvalitativní měření látek rozpustných ve vodě i v organických rozpouštědlech, které podléhají redukčně-oxidačním změnám.

Při voltametii se používá elektrochemický článek tvořený pracovní polarizovatelnou elektrodou a referenční nepolarizovanou elektrodou. Na pracovní elektrodu je vkládán potenciál rostoucí od počáteční hodnoty E_1 do koncové hodnoty E_2 a následně je opět snižován až k počáteční hodnotě E_1 a při jeho změnách se sledují změny v procházejícím proudu (proudová odezva). Voltametrie se používá ke studiu a stanovení látek rozpuštěných ve vodných roztocích i organických rozpouštědlech, ke kvantitativní i kvalitativní analýze a především **ke sledování redukčně-oxidačních vlastností** organických i anorganických látek. Podrobným rozbohem získaných dat je možné zjišťovat např. počet přenesených elektronů, reverzibilitu elektrodových reakcí, stabilitu vzniklých meziproductů, kinetiku jednotlivých reakčních kroků, adsorpci na elektrodě a desorpci látek z elektrody, analyticky monitorovat průběh různých elektrochemických procesů nebo zjišťovat údaje o elektrodách (např. pracovní plocha pomocné platinové elektrody).

Měřicí cyklus lze libovolně opakovat a záznamem je cyklický voltamogram. Elektrolýza probíhá jen v úzké vrstvě kolem pracovní elektrody, proto je možné získat z jednoho roztoku prakticky neomezený počet voltametrických záznamů.

Cyklický voltamogram obsahuje uzavřenou křivku závislosti proudu na měnícím se napětí, kterou tvoří záznam dopředného a zpětného skenu. Základními charakteristikami jsou: anodický potenciál a proud (E_{pa} , I_{pa}), které odpovídají oxidaci redukované formy analytu a dále katodický potenciál a proud (E_{pc} , I_{pc}), které charakterizují redukci oxidované formy analytu. (Obr.21)



Obr.21 Popis cyklického voltamogramu

Potenciál maxima píků (E_{pa} , E_{pc}) je charakteristický pro danou látku (kvalitativní veličina). Proud píku v maximu (I_{pa} , I_{pc}) je úměrný koncentraci látky v roztoku (kvantitativní veličina). Detekční mez koncentrace analytů cyklické voltametrie je asi 10^{-5} mol/litr.

Základním rysem cyklické voltametrie je možnost při zpětném skenu reoxidovat nebo zpětně redukovat látky zredukované či zoxidované při skenu dopředném.⁹² S elektrodovou reakcí typu $Ox^a + n e^- \rightarrow Red^{(a-n)}$ se však setkáváme jen zřídka. Především u organických systémů je reakce přenosu náboje spřažena s předřazenou (CE) nebo následnou chemickou reakcí (EC), kdy dojde např. k přerušení sigma-vazby. Tyto kroky se mohou i řetězit (ECEC), a tato skutečnost je příčinou ireverzibility nebo kvazireverzibility elektrochemické reakce.⁹³

V případě reverzibilního elektrodového procesu dostáváme cyklický voltamogram s dobře vyvinutým katodickým i anodickým píkem (např. elektrochemický standardní systém hexakynoželezitan / hexakynoželeznan draselný na metalické elektrodě), naproti tomu u jiných analytů může probíhat jen kvazireverzibilní reakce a katodický pík je pak pouze naznačen (např. kyselina gallová v acetátovém pufru).

U **reverzibilních** voltamogramů je proud v píku dán Randles - Ševčíkovou rovnicí (4) a pro **ireverzibilní** děje byla odvozena Berzins - Delahayova rovnice⁹⁴ (5), ze kterých vyplývá, že hodnota elektrického proudu v cyklovoltametričké křivce je u vratných i nevratných elektrochemických reakcí přímo úměrná koncentraci analytu a 2. odmocnině rychlosti skenování a nepřímo úměrná teplotě.

$$I_{pa} = I_{pc} = 0.4463nFAc \frac{(nFvD)^{1/2}}{(RT)^{1/2}} \quad (4)$$

$$I_{pa} = I_{pc} = 0.6105 \frac{(nF)^{3/2}}{(RT)^{1/2}} D^{1/2} cv^{1/2} \quad (5)$$

I_{pa}, I_{pc} píkové proudy [A]

A plocha elektrody [cm^2]

n počet vyměňovaných elektronů

D difúzní koeficient [cm^2/s]

c koncentrace analytu [mol/cm^3]

v skenovací rychlost [V/s]

R univerzální plynová konstanta (8.314 J/mol K)

T termodynamická teplota [K]

F Faradayova konstanta (96 485 C/mol)

Pokud výměna nábojů probíhá mezi povrchem elektrody a vrstvičkou elektrolytu při jejím povrchu, je rychlostní konstanta redox procesu tzv. standardní heterogenní rychlostní konstantou k^0 [cm/s], která je funkcí potenciálu. Součin $k^0v^{1/2}$ potom vyjadřuje elektrochemickou reverzibilitu elektrodového děje při běžných skenovacích rychlostech (10 – 100 mV/s):

pro $k^0 > 10^{-1}$ elektrochemicky vratná reakce

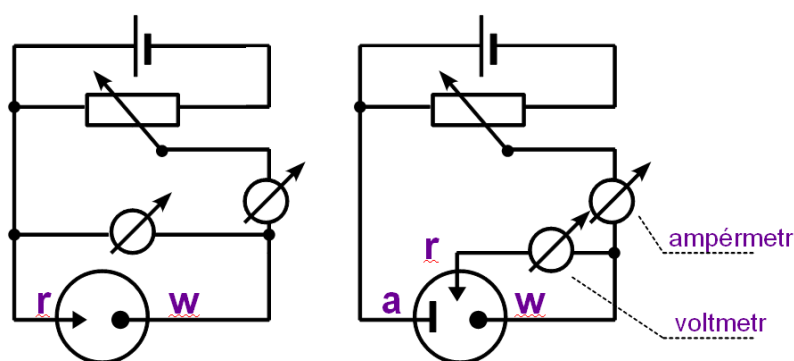
pro $k^0 < 10^{-5}$ elektrochemicky nevratná reakce

pro k^0 mezi těmito hodnotami **kvazireverzibilní** elektrochemická reakce

Pro skenování látek metodou cyklické voltametrie musí být splněno několik základních podmínek: Studovaný analyt musí být rozpustný a musí být schopen se oxidovat či redukovat v oblasti potenciálů dostupných při použití dané elektrody a daného rozpouštědla. Rozsah koncentrací měřeného analytu se musí pohybovat mezi 10^{-5} až 10^{-3} mol/litr, což je dáno jednak mezí citlivosti měření této metody a dále hodnotou, kdy vysoké koncentrace již vyvolávají na elektrodě nežádoucí efekty.

Roztok s rozpuštěným analytem musí být dostatečně vodivý a současně musí mít vlastnosti potlačující vliv migrace studované látky. Proto se do něj přidává sůl základního a indifferenčního elektrolytu v nadbytku, a to o koncentraci alespoň 50x vyšší než je koncentrace studované látky. Úlohu základního elektrolytu splňují velmi dobře anorganické soli pro vodné prostředí (halogenidy, chloristany či dusičnany alkalických kovů a samozřejmě složky běžných pufrů, tedy kyseliny, hydroxidy, fosforečnany, octany, boritany aj.), pro organická rozpouštědla se nejčastěji používají chloristany, tetrafluoroboritany a hexafluorofosforečnany.
92, 93

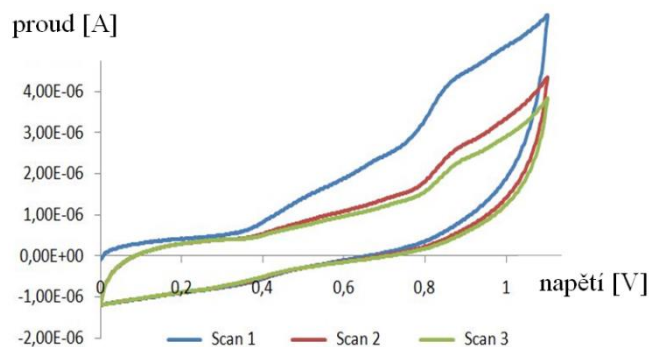
Jednodušší dvuelektrodové zapojení obsahuje **pracovní (w)** a **referenční elektrodu (r)**, moderní tříelektrodové zapojení obsahuje navíc ještě **pomocnou elektrodu (a)**, (obr.22).



Obr.22 Dvou- a tříelektrodové zapojení článku pro cyklickou voltametrii

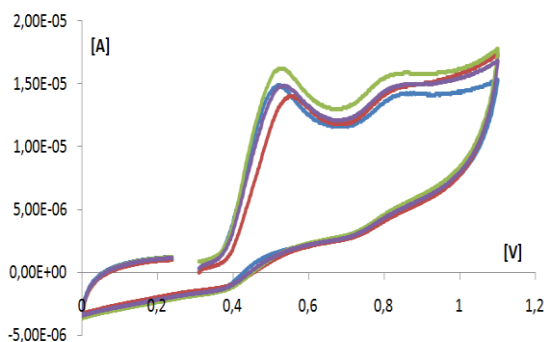
V tříelektrodovém zapojení ve voltametrických analýzách, kde se předpokládá tok elektrického proudu, je přítomna doplňková pomocná elektroda. Pokud pracovní elektroda funguje jako anoda, pomocná elektroda plní funkci katody a naopak. Potenciál pomocné elektrody se zpravidla neměří a je upraven tak, aby vyrovnával reakce probíhající na pracovní elektrodě. Tato konfigurace umožňuje měření potenciálu pracovní elektrody vzhledem k referenční elektrodě tak, aby průchod elektrického proudu neohrožoval stabilitu referenční elektrody. Pokud probíhá měření ve vodném roztoku a na měrné elektrodě probíhá redukce, může se na pomocné elektrodě vyvíjet kyslík, proto je vhodné oddělit pomocnou elektrodu pomocí skleněné frity. Pomocná elektroda bývá vyrobena z elektrochemicky inertního materiálu (např. platina, zlato nebo uhlík).

Jako pracovní elektroda slouží nejčastěji elektroda ze skelného uhlíku (*glassy carbon*), uhlíková pasta, uhlíkové vlákno, platina, zlato nebo rtuť. Jako srovnávací (referenční) elektrodu lze použít kalomelovou elektrodu, merkurosulfátovou, vodíkovou nebo argenticchloridovou. Pomocnou elektrodu tvoří nejčastěji platinový drát nebo plíšek. Měřicí přístroj (potenciostat) nutí procházet mezi pracovní a srovnávací elektrodou takový proud, aby byl mezi těmito elektrodami dodržen určitý potenciálový program.



Obr.23 Pokles odezvy při opakovaném skenu CV vlivem adsorpce analytu na pracovní elektrodu

Obecným problémem u mnoha analytů je to, že se vyoxidovávají či vyredukovávají na pracovní elektrodě. To je typicky problém skenování polyfenolických látek - tím s dalším skenem dochází ke snížení signálu (obr.23). Redoxní přeměny látek adsorbovaných na povrchu elektrody totiž probíhají za jiných potenciálů než redoxní přeměny analytů volně přítomných v roztoku, proto je nutné před každým dalším skenem pracovní elektrodu důkladně vyleštit. Používá se k tomu dostatečně jemné abrazivum jako je diamantová pasta nebo alumina (chemicky připravený oxid hlinitý). Dalším úskalím je samotná velká citlivost metody. Metoda je zároveň citlivá na vnesené chyby, a tak i při rutinním zvládnutí přípravy vzorku a čištění elektrody může docházet k nepřesnostem (obr.24).



Obr.24 Záznamy prvních skenů téhož roztok (0.5 mM kyselina gallová)

2.6 Využití odpadů v textilním barvení

Vedle cíleného pěstování barvířských rostlin se nabízí mnohem progresivnější varianta, a tou je využití odpadů z potravinářské, lesnické nebo zemědělské výroby. Průmyslová výroba potravin a nápojů produkuje obrovské množství biologických odpadů, jako jsou lisované plody, destilační zbytky, výlisky a další zbytkové vedlejší produkty, které obsahují značné množství rostlinných barviv, která mohou být využita v textilním průmyslu.

Snad nejvíce studovaným barevným zemědělským odpadem jsou výlisky z révy, vzhledem k produkci vína, která v některých zemích (Francie, Itálie, USA, Čína) dosahuje každoročně miliony hektolitrů. Extrakce a barvení textilií anthokyaniny obsaženými v modré révě jsou řešeny v několika studiích.^{34, 35, 95, 96, 97, 98} Závažným problémem je však nestabilita odstínu a také poměrně nízká světlostalost těchto produktů, i když především v názoru na světlostalost textilií barvených anthokyaniny nejsou autoři jednotní.

Další barevné odpady jsou produkovány moštárnami a konzervárnami – většinou jde o výlisky z ovoce bohatého na anthokyaniny (červený a černý rybíz, třešně, višně, angrešt) nebo o odpady z barevné zeleniny s obsahem anthokyaninů či betalainů (červené zelí, červená řepa, cibule). Těžba dřeva zase přináší množství odpadního materiálu v podobě kůry stromů, která je, jak již bylo uvedeno výše, bohatým zdrojem taninů. Ty mohou sloužit nejen jako mořidla, ale zároveň jako textilní barviva, protože kůra stromů (např. dub, bříza, olše, jírovec) má schopnost barvit především přírodní vlákna na různé odstíny hnědé barvy.^{99, 100}

Vliv taninů na vybarvení je u hnědých a černých odstínů často dominantní, ale s všudypřítomností taninů je třeba počítat i při barvení přírodními barvivy obecně, protože často jsou právě taniny v rostlinných extraktech příčinou kalnosti barevných odstínů.¹⁰¹

Intenzivnější využívání průmyslového odpadu jako obnovitelné suroviny pro výrobu přírodních barviv představuje strategii "udržitelné čistší produkce". Barvířské využití levných vedlejších produktů z jiných výrobních procesů je zajímavý koncept, který může po pečlivé optimalizaci barvicího procesu a znalosti systému dodavatelského řetězce snížit náklady spojené s výrobou přírodních barviv.¹⁰²

Přírodní barviva by měla být levným, netoxickým, obnovitelným a udržitelným zdrojem s minimálním environmentálním dopadem. Přestože výzkum v této oblasti, dá se říci, běží po celém světě na plné obrátky, přesto stále existuje řada technických problémů v každé oblasti aplikace přírodních barviv, které je třeba překonat, aby tyto technologie mohly být přijaty ve velkém měřítku do praxe. Vyřešení všech problémů spojených se zavedením nových technologií pro výrobu a využití přírodních barviv je však dlouhodobým úkolem a perspektivou.

2.6.1 Barevné odpady

Vinná réva je jedna z nejdůležitějších světových zemědělských plodin. Produkce vína však sebou nese i velké množství odpadního materiálu v podobě výlisků (slupky, pecky, třapiny), které jsou po maceraci a prokvašení stále velmi bohaté na obsah fenolických látek, které nacházíme ve víně a jejichž zdrojem jsou bobule vinné révy, především na barviva (anthokyany u modré révy) a kondenzované taniny. V menším množství jsou zde obsaženy další fenolické látky, např. resveratrol a kvercetin. Celkový obsah polyfenolů v červeném víně se pohybuje od 2 do 6 g/litr a většina z nich připadá na (oligo)flavanoly (1 - 5 g/litr, včetně katechinu s obsahem 0.1-0.2 g/litr) a anthokyany (0.1 – 1.5 g/litr).⁹ Všechny tyto látky mají výrazné biogenní účinky: především se jedná o antioxidanty a látky schopné zhaset volné radikály.¹⁰³

Ve srovnání s tradičními vinařskými giganty jako jsou Francie, Itálie, Španělsko, USA nebo Čína¹⁰⁴, jejichž roční produkce vína se pohybuje řádově v desítkách milionů hektolitrů¹⁰⁵, je Česká republika jen okrajovým producentem této plodiny (kolem 800 tisíc hektolitrů vína ročně)¹⁰⁶, přesto i u nás činí vinařský odpad nezanedbatelné množství řádově desítek tisíc tun ročně.

Od doby, kdy císař Karel IV. svými nařízeními inicioval zakládání vinic v českých zemích, prošlo české a moravské vinařství značným vývojem. Tradice pěstování vinné révy a produkce vína však v našich zemích zůstala za ta staletí velmi silná a produkce vína v našich zemích má stále rostoucí trend, přestože úsilí vinařů komplikují časté výkyvy počasí, révové choroby a škůdci i ekonomické problémy. V roce 2012 činila plocha osázená vinicemi cca 17 tisíc hektarů, z nichž zhruba třetina připadala na modré odrůdy.¹⁰⁷ Z modrých odrůd vinné révy se u nás tradičně pěstuje především Svatovavřínecké, Frankovka, Zweigeltrebe, Rulandské Modré nebo Modrý Portugal¹⁰⁸, objevují se však i nově vyšlechtěné odrůdy, jako je např. Fratava, Jakubské, Acolon nebo Kofranka.¹⁰⁹ Tradičními producenty červených vín jsou hlavně vinaři z Mělnicka, Litoměřicka, Znojemska a Velkopavlovické oblasti.

Příklad maximálního využití odpadu z révy představuje např. francouzská firma Grap'Sud¹¹⁰, která se specializuje na extrakci látek z révových výlisků a jejich použití v nutraceutice, farmacii a kosmetice. Konečně i u nás již několik výrobců zpracovává tento hodnotný odpad a lisuje olej z hroznových jader, nicméně čeští vinaři dosud většinou příliš neřeší onu nerudovskou otázku „kam s ním“ a v naprosté většině končí výlisky zaorány zpět ve vinicích. Ve světě bývají výlisky dále využívány v palírnách k destilaci ethanolu, případně jako krmivo pro zvířata, z pecek se lisuje olej a zbytek může být opět zkrmován a to, co již nelze zpracovat jinak, končí jako biomasa pro výrobu bioplynu a hnojivo.¹¹¹ U nás je v podstatě využívána jen poslední možnost, kdy výlisky končí zaorány zpět ve vinicích. To se může jevit jako výhodný recyklační proces, ale některé studie poukazují na to, že kompostování výlisků může být v dlouhodobém výhledu spíše problémem. Přírodní prostředí je tak kontaminováno velkou koncentrací taninů a dalších polyfenolických komponent, které působí fyto toxicky a mohou i negativně ovlivňovat kvalitu vody.¹¹² Fenolické látky totiž okyselují půdu a díky svým antimikrobiálním účinkům brání mikrobiálnímu rozkladu organické hmoty a vzniku humusu, což podporuje spíše růst hub a plísní, čímž dochází k posunu v koloběhu dusíku a k pomalejší recyklaci organické hmoty.

Barevné anthokyany obsažené ve výliscích z révy mohou nalézt další využití vedle potravinářství i v textilním barvířství, v kosmetice a farmacii (antioxidanty a protizánětlivé léky) a jako vstupní surovina v dalších průmyslových odvětvích (např. kondenzované taniny pro výrobu pryskyřic, pojiv a dřevotřísek) před tím, než je již dále nevyužitelný dřevnatý zbytek zužitkován v podobě paliva (brikety, pelety).

Hlavní důvody, proč věnovat pozornost a snahu dalšímu využití těchto odpadů, jsou ochrana životního prostředí a ekonomický přínos, protože se jedná o levný zdroj cenných fenolických sloučenin.

Červenou řepu u nás průmyslově zpracovávají konzervárny především do salátů. Objemy zpracované středně velkým konzervářským podnikem, kterých je v ČR několik, se pohybují řádově v desítkách tun ročně, asi pětinu tohoto objemu tvoří odpad, který nejčastěji končí zaorán zpět na poli. Odhadem tedy u nás vzniká ročně několik set tun nevyužitého řepného odpadu. Také tento barevný odpad lze před recyklací využít jako zdroj přírodního barviva pro barvení některých textilií.⁷²

Dubová kůra je materiál, který vzniká jako odpad při těžbě a zpracování dřeva. Je bohatým zdrojem taninů (tríslovin), i když jejich obsah u jednotlivých druhů (nejen) dubů značně kolísá. Např. u nás běžně rostoucí dub zimní (*Quercus petraea*) obsahuje v kůře 8-20% tríslovin, přičemž nejvíce jich obsahuje 2.5 – 4 mm silná kůra 9-10letých stromů. Středomořský dub *Quercus macrolepis* obsahuje v kůře dokonce až 30-42% tríslovin.⁵⁰

2.6.2 Barvení taniny

Některé rostlinné extrakty kombinují vlastnosti přírodních barviv a rostlinných léčiv, takže konečný produkt má nejen schopnost barvit tkaniny, ale i léčivé a antiseptické vlastnosti. V přírodním barvení jsou často aplikovány výtažky z rostlin, které jsou směsí různých látek, ve kterých všudypřítomné rostlinné třísloviny hrají důležitou roli.

Třísloviny (taniny) obsažené v kůře stromů (duby, škumpa, jírovec, bříza aj.) byly odedávna používány nejen jako mořidla či prostředek k vyčiňování kůží, ale také jako přírodní barviva. Konkrétně dubová kůra dává na vlně sytější hnědé barvy, bavlnu barví světlejšími odstíny.

Dubová kůra obsahuje totiž kromě kyseliny tříslové další látky použitelné jako barviva – např. žluté barvivo **kvercitrin** bylo izolováno z kůry severoamerického dubu sametového (*Quercus velutina*)¹¹³ a od konce 18. století bylo z kůry těchto dubů průmyslově získáváno, vyváženo a používáno k barvení. Chemicky se jedná o rhamnoglykosid kvercetin (C. I. 75720/ Natural Yellow 10¹¹⁴). Na vlně a bavlně mořené kamencem nebo dichromanem draselným dává různé odstíny žluté až žlutohnědé barvy.¹¹⁵

Kůra severoamerického dubu horního (*Quercus montana*), který se vyskytuje od Maine po Alabamu, barví kamencem mořenou vlnu světle hnědě, dichromanem draselným mořenou vlnu žlutohnědě. Také kůra dubu červeného (*Quercus borealis*, *Quercus rubra*), což je původně severoamerický dub, který se u nás pěstuje běžně jako okrasná parková dřevina, se dá použít k barvení textilií. Na růžovohnědou barvu barví vlnu bez moření a bavlnu mořenou kamencem. Vlnu mořenou kamencem obarví světle hnědě, dichromanem žlutohnědě. Kůra dubu bílého (*Quercus alba*) zase dává na vlně s kamencem temně žlutou a s dichromanem khaki barvu. Všechny tyto barvy na vlně a bavlně mají údajně vesměs dobré stálosti jak v praní, tak i na světle.¹¹⁵

Za barvicí schopnosti extraktů z kůry a listů většiny stromů jsou však zodpovědné především v nich obsažené **katechiny** (obr.6). Jsou to polyfenolické látky, které se mohou vázat na vlákenný substrát několika mechanismy:

1. **iontovou vazbou** mezi deprotonizovanou fenolovou skupinou a protonizovanými aminoskupinami bílkovinných vláken (vlna, hedvábí) a polyamidu
2. četnými **vodíkovými můstky**, které vznikají mezi pseudovakantními orbity vodíků fenolových skupin (pokud nejsou disociovány) s volnými elektronovými páry kyslíku, případně dusíku ve struktuře vláken
3. **kovalentními vazbami**, které mohou vznikat mezi chinonovými a semichinonovými skupinami přítomnými v taninu a vhodnými reaktivními skupinami vláken.

Vazba polyfenolů - taninů a především katechinů na bílkoviny je dobře známa. Katechiny jsou součástí především kondenzovaných taninů, proanthokyanidinů, které se velmi silně váží s aminokyselinou prolinem, která je obsažena až v 70% všech bílkovin v lidských slinách.^{116, 117, 118} Po vypití zeleného čaje měly testované osoby hladinu katechinů ve slinách až o dva řády vyšší než v krevní plazmě.¹¹⁹ Z řady biologických studií je také známa silná afinita katechinů k albuminu^{120, 121} (bílkovina v krevním séru). Obecně tedy lze říci, že bílkoviny (tedy i živočišná vlákna tvořená bílkovinou keratinem) mají silnou afinitu ke katechinům, proanthokyanidinům a snad i polyfenolům obecně. (Aminokyselina prolin je obsažena i v ovčí vlně, kde tvoří asi 6.5% ze všech aminokyselin v keratinu).¹²²

Při síťování kolagenu rostlinnými polyfenoly (více viz kapitola 7.1 *Síťování kolagenu*) – např. katechinem nebo kyselinou tříslovou - je za potenciální místo interakce polyfenolů s kolagenem považována hydroxylová skupina aminokyselin hydroxyprolinu a serinu, karboxylová skupina kyseliny asparagové, dále aminoskupina lysinu a amidová skupina

asparaginu.¹²³ Stupeň zesíťování kolagenu lze následně zjistit proměřením mechanické odolnosti kolagenu vůči různým destabilizačním faktorům - vystavení účinku degradačních enzymů (kolagenázy, případně pankreatické proteázy), proměření tepelné stability kolagenu (tzv. test hydrotermální kontrakce), proměření tepelné závislosti stress-strain křivek a o stabilitě kolagenu také mnohé vypovídají změny jeho mechanických vlastností po vystavení denaturačnímu účinku močoviny.¹²³ Test hydrotermální stability (test hydrotermální kontrakce) spočívá v pozorování kolagenních vláken v mikroskopu s vyhříváním stolcem pro preparát (případně v měření závislosti kontrakční síly upnutých vláken na teplotě), kdy se zjišťuje teplotní mez, při které dochází zahříváním vláken ve vodném prostředí ke smrštění až na třetinu jejich délky. Neošetřená vlákna (nativní kolagen) kontrahují při 61 °C, vlákna síťovaná 20 mM katechinem kontrahují až při 70 °C. Stupeň zesíťování a odolnost kolagenu lze zjišťovat i pomocí močoviny, která má na proteiny denaturační činky, protože rozrušuje vodíkové vazby. Zatímco hydrotermální stabilita nativního kolagenu klesá velmi rychle s rostoucí koncentrací močoviny, tak si např. kolagen ošetřený 10 mM katechinem zachoval značnou stabilitu i při působení 4 M koncentrace močoviny (rozdíl teplotních mezí při testu hydrotermální kontrakce byl 30 °C!¹²³). Zachování vysoké stability katechinem síťovaného kolagenu i po vystavení dehydrogenačnímu účinku močoviny tedy znamená, že na vazbě katechinů s kolagenem (tedy obecně polyfenolů s bílkovinami) se kromě vodíkových vazeb musí podílet i jiné – hydrofobní - interakce, zde patrně reakce benzenpyranového kruhu katechinu s hydrofobními úseky kolagenu.¹²⁴

Řada taninů, respektive katechinových derivátů (katechin, epikatechin, epigallokatechin, katechin gallát aj.), byla izolována z kůry kořenovníků, které vytváří mangrovové porosty v přílivových lagunách s brakickou vodou na mořských pobřežích a v říčních deltách tropického pásma. Např. extrakt z kůry východoasijského kořenovníku *Rhizophora apiculata* dává na hedvábí s kamencem nebo modrou skalicí různé odstíny hnědočervené barvy, se zelenou skalicí odstín šedočerný, většinou s mokrymi stálostmi stupně 4-5 a světlostálostí stupně 3-5, pouze ve spojení s chloridem cínatým byla pozorována velmi špatná světlostálost stupně 1, a to nejen při barvení vlny, bavlny a hedvábí, ale i na polyamidu, acetátovém hedvábí a viskóze.¹²⁵ Podobné výsledky vybarvení a stálostí byly dosaženy při barvení hedvábí pomocí listů eukalyptu.^{24, 126}

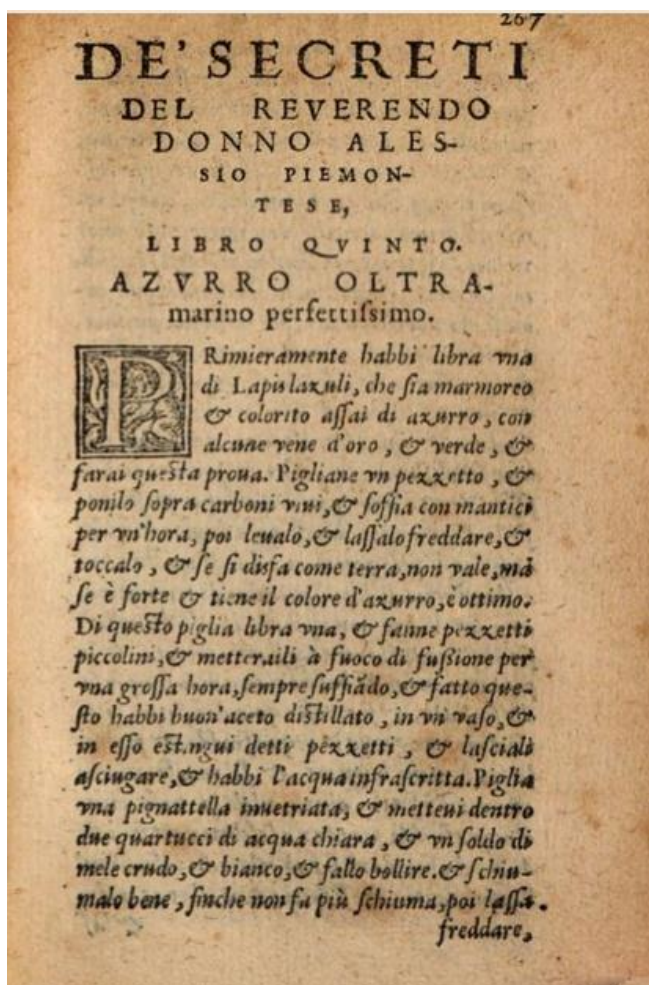
Adstringentní a antibakteriální schopnosti extraktů z dubové kůry^{126, 127, 128} byly odedávna využívány v lidovém léčitelství a vrací se k nim i současná medicína, farmacie a kosmetický průmysl.¹²⁹ Také u řady textilií obarvených dubovou kůrou nebo i kůrou či listím z jiných stromů jsou často pozorovány vlastnosti, které vláknům tyto extrakty dodávají, jako např. zvýšená ochrana před UV zářením^{130, 131} nebo schopnost potlačovat růst bakterií.^{125, 132}

2.6.3 Barvení anthokyany

I když mají anthokyany nestabilní odstíny a nízkou světlostálost, přesto byly odedávna používány k barvení textilií a později i ke kreslení na papír. Už Plinius starší zmiňuje, že v Galii se používaly borůvky k barvení oděvů určených pro otroky na fialovo.¹³³

Bez přídavku anorganických mořidel barví anthokyany textilie na červenohnědé odstíny, s kamencem dávají především na vlně odstíny žlutohnědé⁵⁰ a reakcí s železnatými ionty se odstín mění do šedé až černé.

Ve středověku se používaly borůvky, brusinky, plody černého bezu a další plody s obsahem anthokyanů nejen k barvení textilií, ale i ke zdobení knih a karet. V knize „*Secreti*“ (Tajemství) z roku 1555 (obr.25), která je jakousi sbírkou lékařských receptů a různých výrobních technologií včetně barvířských postupů, popisuje v 5. dílu italský spisovatel Alessio Piemontese, jak lze pomocí šťávy z borůvek nebo plodů černého bezu s přídavkem



Obr.25 Ukázka z knihy „*Secreti*“ Alessia Piemonteseho z r.1555¹³⁵

hlinitých, měděných nebo železitých mořidlových solí dosáhnout modrých odstínů na lnu.¹³⁴ Pozdější recepty uvádí, jak lze obarvit vlnu borůvkovou šťávou na fialovomodrou barvu s použitím kamence, na modrofialovou barvu s použitím solí cínu a na modročernou barvu s použitím solí železa.⁵⁰

Ve Skotsku se dříve používaly mrazem přešlé plody ptačího zobu (*Ligustrum vulgare*) k barvení vlny předmořené solemi hliníku, železa a s přídavkem sody k dosažení temně modré barvy. A na Shetlandských ostrovech běžně barvili vlnu na fialovomodrý odstín pomocí borůvkám podobných plodů z keříků šichy černé (*Empetrum nigrum*) ještě v roce 1840.^{136, 137}

Plody černého bezu, které jsou bohaté na chrysanthemín a sambucín (deriváty kyanidinu), se barvila bavlna předmořená síranem měďnatým (modrá skalice) na fialovomodrý odstín, který se po následném mydlení změnil na nebeskou modř a s octem na lila odstín. Vlna předmořená kamencem se bezinkami obarvila na matně hnědofialovou.¹³⁸

Šťáva z ostružin, které obsahují také především deriváty kyanidinu, zase prý obarví len namořený kamencem na karmínovou červen, která se přídavkem potaše změní na modrou; bez moření se len obarví na ametystový odstín fialové.¹³⁸

Černý rybíz, který je bohatý na obsah derivátů kyanidinu a delfinidinu, lze zase použít při barvení hedvábí předmořeného tzv. dávivým (vinným) kamenem (vínan antimonylo-draselný, $K[C_4H_2O_6Sb(OH_2)].1/2H_2O$) na fialovomodrou barvu, s použitím octanu hlinitého na

fialovou, višně s obsahem glykosidů kyanidinu obarví kamencem předmořenou vlnu na fialové a šedé odstíny⁵⁰, atd.

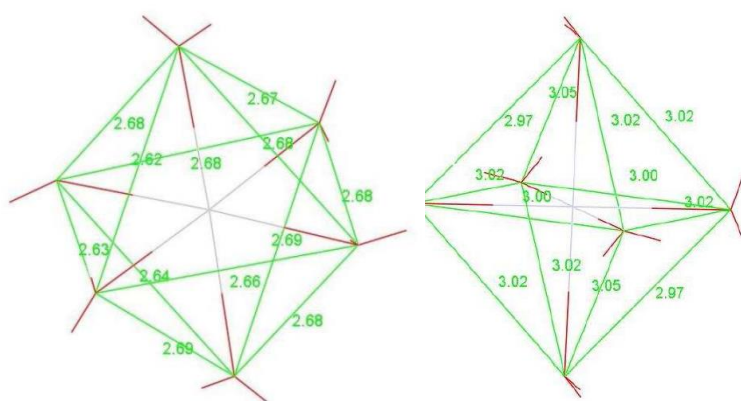
Novodobé studie, které se zabývají barvením anthokyany, používají k barvení mj. plody modré révy nebo výlisky z těchto plodů. K barvení je používán čerstvý nebo sušený materiál, barvicí lázeň bývá nejčastěji připravena extrakcí anthokyanů varem ve vodě. Maximum anthokyanů extrahovaných za varu je pozorováno v průběhu prvních 30 - 45 minut.

Anthokyany nejlépe barví živočišná vlákna – vlnu^{34, 35, 95, 96} a přírodní hedvábí⁹⁸, ale jsou jimi barvena i rostlinná vlákna (bavlna³⁵, juta⁹⁷). Při barvení je používáno nejčastěji předmoření taninem, kamencem nebo zelenou skalicí.

Podobně jako mají taniny a zvláště katechiny silnou afinitu k některým aminokyselinám (prolin, hydroxyprolin) – viz kapitola 2.6.2 *Barvení taniny* – tak se i mnohé biochemické a farmakologické studie zaměřené na metabolizaci léčivých látek v lidském těle zabývají interakcí flavonoidů a bílkovin. Tak bylo např. zjištěno, že řada flavonoidů (glykosylované deriváty kvercetinu, luteolinu a apigeninu) se dobře váže se sérovým albuminem.¹³⁹ Pomocí počítačových molekulárních modelů porovnávaných s vazebnou energií a fluorescenční spektroskopii byl prokázán vznik mnohočetných vodíkových vazeb, které vznikaly mezi hydroxyly těchto flavonoidů a konkrétními aminokyselinami albuminu¹³⁹ (argininem, lysinem, histidinem, alaninem, tryptofanem a fenylalaninem). Řada těchto aminokyselin je také přítomna v keratinu (vlně) v nezanedbatelném množství - např. arginin 6.5%, lysin 3.2%, alanin 6.0%, fenylalanin 2.3%.¹²²

Různí experimentátoři se však rozcházejí v závěrech o stálostech v praní, které se pohybují mezi stupněm 3–5 a nejasnost vyvolávají především různorodé údaje o světlostálosti, která se i u stejně mořených textilií pohybuje od velmi nízkých hodnot (stupeň 1³⁴) po velmi dobré (stupeň 4³⁵) až „výborné“⁹⁶ a takto jsou obarvené tkaniny i různými autory slovně hodnoceny. Anthokyany byly také označeny za barviva s nejlepší světlostálostí z vybraných testovaných barviv (kurkuma, chlorofyl aj.).¹⁴⁰

Zajímavý pohled na interakci mořidel, flavonoidních barviv a celulózových vláken na základě prostorového uspořádání molekul přináší diplomová práce studentky Pedagogické fakulty TUL.¹⁴¹ Vychází z předpokladu, že vazba mořidlového kationtu s kyslíky disociovaných hydroxylových skupin flavonoidních barviv (anthokyany, kvercetin) je tím silnější a pravděpodobnější, čím více se délkou blíží vzdálenosti atomů kyslíků z vodných ligandů uspořádaných kolem centrálního kovového iontu v komplexních kationtech. Tyto vzdálenosti zjišťuje na jejich krystalografické 3D struktuře a zároveň provádí simulaci molekulární dynamiky na modelu barvivo - celulóza softwarem ChemOffice 3D, která naznačuje možnou tvorbu vodíkových můstků mezi těmito molekulami v prostorově nejpravděpodobnějších místech.

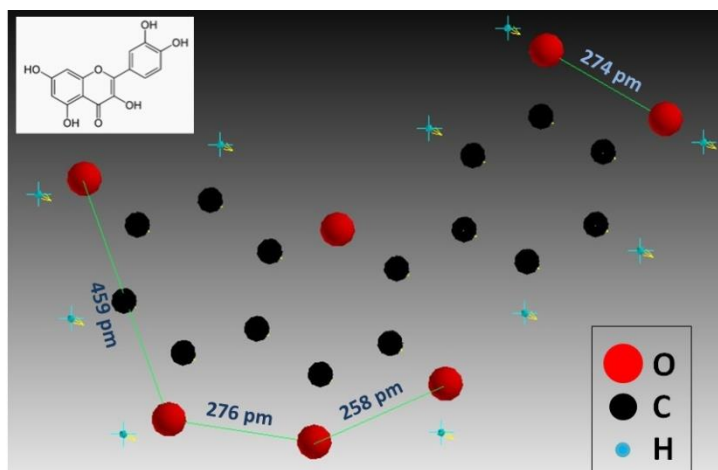


Obr.26 Ideální krystalografická struktura hexaakvahlinitého (vlevo) a hexaakvaželeznatého kationtu (vpravo) s vyznačenými vzdálenostmi mezi kyslíky vodných ligandů (hodnoty v angströmech)¹⁴⁴

S použitím příkladu hexaakvahlinitého a hexaakvaželeznatého kationtu (obr.26¹⁴¹) dochází na základě vzdáleností atomů kyslíku k závěru, že vzdálenostem mezi kyslíky v kvercetinu a

fakulty TUL.¹⁴¹ Vychází z předpokladu, že vazba mořidlového kationtu s kyslíky disociovaných hydroxylových skupin flavonoidních barviv (anthokyany, kvercetin) je tím silnější a pravděpodobnější, čím více se délkou blíží vzdálenosti atomů kyslíků z vodných ligandů uspořádaných kolem centrálního kovového iontu v komplexních kationtech. Tyto vzdálenosti zjišťuje na jejich krystalografické 3D struktuře a zároveň provádí simulaci molekulární dynamiky na modelu barvivo - celulóza softwarem ChemOffice 3D, která naznačuje možnou tvorbu vodíkových můstků mezi těmito molekulami v prostorově nejpravděpodobnějších místech.

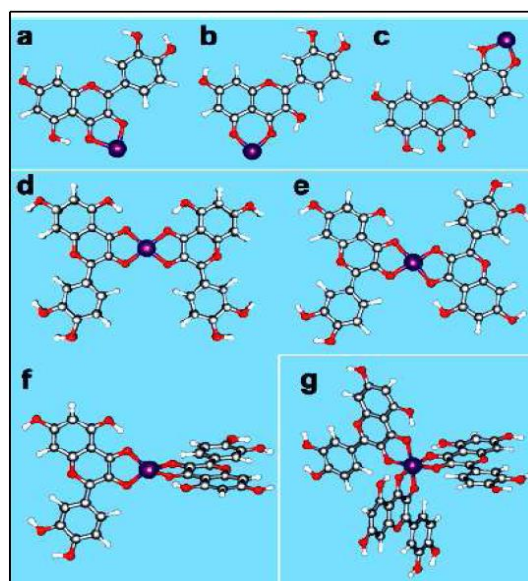
v anthokyanidnech kyanidinu a jeho rutinoidu sambucinu se lépe blíží uspořádání kyslíků v hlinitém (vzdálenost kyslíků kolem 250-270 pm), než železnatém kationtu (vzdálenost kyslíků kolem 300 pm), a to především v hydroxylových skupinách v pozicích C3' a C4' flavanolového kruhu B a dále u kvercetinu ještě navíc na pozicích C3, C4 a C4, C5 kondenzovaných kruhů C a A. To by mohlo znamenat mnohem pravděpodobnější a pevnější koordinační vazbu flavonoidních barviv s hlinitými solemi než s železnatými. Na obr.27 jsou znázorněny vzdálenosti mezi atomy kyslíku v kvercetinu v pikometrech (10^{-12} m) na molekulárním modelu, který jsem vytvořila v programu SurfCam na základě dat stažených z databáze ChemSpider¹⁴², z nichž ty mezi pozicemi C3'-C4', C3-C4 a C4-C5 skutečně hodnotám hexaakvahlinitého kationtu dobře vyhovují.



Obr.27 Vzdálenosti kyslíků v hydroxylových skupinách kvercetinu (vytvořeno SW SurfCam podle dat z databáze ChemSpider¹⁴²)

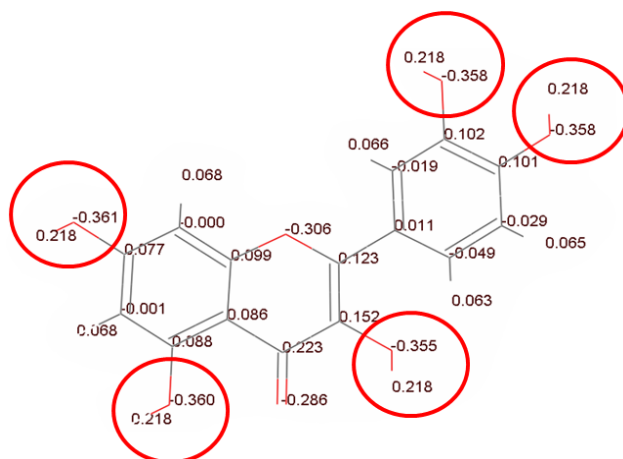
(pozn.: Reakce flavonoidů s chloridem hlinitým ($\text{AlCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) a dusitanem sodným je skutečně jedna ze spektrofotometrických analytických metod vypracovaných pro kvantitativní stanovení flavonoidů v rostlinném materiálu, při které se používá kvercetin nebo rutin (glykosylovaný kvercetin) jako standard a absorbance se měří při 415 (425) nm.^{143, 144}

A také opačně - dříve se u nás používala tato zkouška v potravinářství jako oficiální analytická metoda ke stanovení hliníku v rýži, opět s kvercetinem jako standardem).



Obr.28 Modely vazby Fe^{+2} a kvercetinu podle ¹⁴⁵

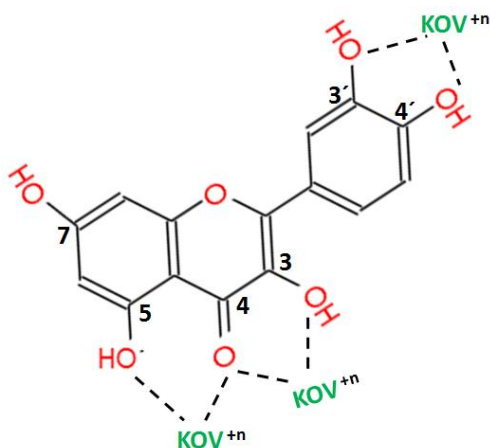
Na základě stejné metody zmíněná diplomová práce hodnotí několik možných variant prostorového uspořádání vazby jedné a více molekul kvercetinu se železnatým iontem navržených ve studii¹⁴⁵ (obr.28) a dochází k závěru, že se jako nejpravděpodobnější jeví varianty a) a c), tj. mezi kyslíky v polohách C3', C4' a C3, C4, zatímco ostatní varianty jsou na základě měřených vzdáleností hodnoceny jako málo pravděpodobné.¹⁴¹ Tento závěr také dobře koreluje s modelem rozložení parciálních nábojů na kvercetinu (obr.29).



Obr.29 Rozložení parciálních nábojů na kvercetinu, označeny pozice s největším rozdílem (nejreaktivnější místa) [podle ¹⁴¹]

Důkladnějším studiem dostupných publikací, které se věnují chelataci kovových iontů flavonoidy jsem však zjistila, že vědci nejsou příliš jednotní v názoru, které skupiny se opravdu u jednotlivých flavonoidů do komplexace s kovy zapojují a že tato problematika je ve skutečnosti mnohem složitější.

Elektrochemické studie ukazují tři charakteristické oxidační píky flavonoidních molekul.¹⁴⁶ Tyto píky jsou výsledkem oxidace následujících skupin: (obr.30)



Obr.30 Reaktivní místa ve flavonoidech (oxidace, chelatace)

1. hydroxyly v polohách C3' a C4', případně C3', C4' a C5' na kruhu B (catecholová, resp. pyrogallolová skupina, což jsou nejreaktivnější redox skupiny ve flavonoidní struktuře),
2. hydroxyl v poloze C3 na kruhu C,

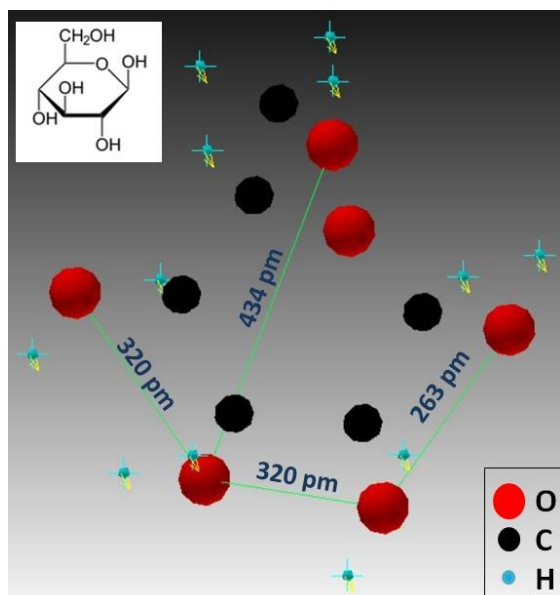
3. hydroxyly v polohách C5, C7 na kruhu A (resorcinolová skupina).

V některých flavonoidech však může interagovat s kovovými ionty i karbonylová skupina v poloze C4 na kruhu C).¹⁴⁷

Některé studie naznačují, že hydroxylové skupiny v poloze C3' a C4' jsou primárním chelatačním místem.^{148, 149} Každopádně vzhledem k tomu, že v závislosti na experimentálních podmínkách může dojít postupně k chelataci se dvěma molekulami flavonoidu, znamená to, že existují dvě ligační místa na stejné flavonoidní struktuře. I když všeobecně při tvorbě komplexních sloučenin kovů s flavonoidy převažuje stechiometrický poměr 1:1, občas vznikají i komplexy se dvěma molekulami flavonoidů, což je patrně maximum - struktury se třemi nebo více flavonoidy v komplexu skutečně nejsou příliš pravděpodobné ani stericky příznivé.

Kromě samotné struktury komplexačního flavonoidu a akceptorového kovového iontu jsou důležité i reakční podmínky této interakce, především pH. Např. kvercetin i 3-hydroxyflavon tvoří s Ni^{+2} a Co^{+2} ionty v mírně kyselém prostředí komplexy v poměru 1:1, rutin za podobných podmínek s týmiž ionty tvoří komplexy v poměru 1:2.¹⁴⁷ S Fe^{+3} ionty byly pozorovány u kvercetinu komplexy se stechiometrií 1:2 při pH 4.0 - 5.0 a 1:1 při pH 6.0 - 8.0¹⁵⁰, s Fe^{+2} ionty tvoří kvercetin při pH 7.2 komplexy v poměru 1:1 i 1:2.¹⁵¹

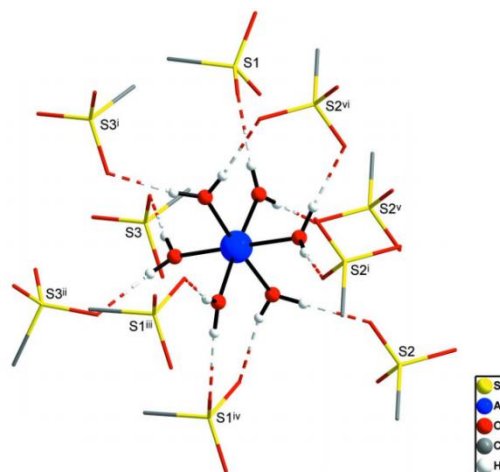
Ukazuje se, že kvercetin má dvě možná místa pro koordinačně kovalentní vazbu s ionty Fe^{+2} : první leží mezi hydroxylem na C3 a karbonylovou skupinou na C4, a druhé místo odpovídá hydroxylům na polohách C3' a C4'.¹⁴⁹ Navzdory obecnému chelatačnímu modelu flavonoidů z obr.30 byla u kvercetinu hypotéza o vzniku komplexní vazby v místě hydroxyly na C5 a karbonylu na C4 zamítnuta¹⁵² srovnáním s cyklickými voltamogramy dalších flavonoidních derivátů s hydroxylovými skupinami v jiných polohách (např. katechin, chrysin, morin). Autoři prokázali, že hydroxyl v poloze C5 a karbonyl na uhlíku C4 nemohou vytvářet chelatační místo, pokud je sousední pozice obsazena. Cyklická voltametrie zároveň prokázala, že komplexace s Fe^{+2} ionty navíc zvýšila antioxidační kapacitu kvercetinu zhruba o 32 %. V pH podmínkách experimentu (pufrováno na pH 7.4) byla u kvercetinu, morinu, katechinu a chrysinu navržena přednostní tvorba komplexů Fe^{+2} - flavonoid v poměru 1:1 s kovovým iontem vázaným v hydroxylové C3 a karbonylové C4 skupině na kruhu C.



Obr.31 Model molekuly glukopyranózy se vzdálenostmi molekul kyslíku (vytvoreno pomocí SW SurfCam podle dat z databáze ChemSpider¹⁴⁵)

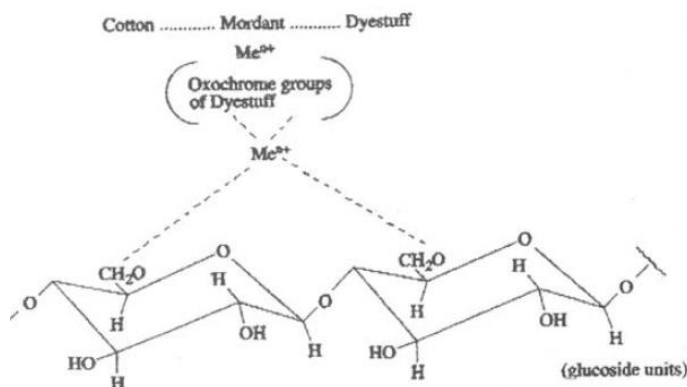
Pro vazbu komplexu kov-barvivo na textilní substrát je nejvhodnější komplex v poměru 1:1, protože poskytuje možnost chelátové vazby kovového kationtu na sousedních hydroxylových skupinách. Tento model tedy platí především pro rostlinná vlákna, jejichž základem je celulóza, respektive glukóza (glukopyranóza) – bavlna, len, juta atd. Vzdálenosti atomů kyslíku v hydroxylech glukopyranózy (obr.31) v rozsahu 263 – 434 pm (respektive hydroxidy v polohách C1 a C4 jsou součástí β -glykosidické vazby polymerní celulózy a jsou volné jen v terminálních částech řetězců) ukazují na nejvhodnější chelatační vazbu pro kovový iont s hydroxyly na uhlících C2 – C3 (320 pm). Tato vzdálenost podle výše popsané hodnotící metody prostorového uspořádání akvaligandů vyhovuje spíše chelatační vazbě celulózy s železnatým než hlinitým iontem, nicméně i zde je jistě

problematika složitější. Ligandy akceptorového kationtu mořidlové soli jsou totiž konformačně ovlivněny vzájemnými interakcemi všech atomů celého komplexu kationt soli – aniont soli - barvivo a výsledné uspořádání ve skutečnosti není ideálně symetrické, jak je to znázorněno na obr.26 – viz asymetrické uspořádání molekuly tris methansulfonátu hexaakvahlinitého (obr.32).



Obr.32 Asymetrická struktura hexaakvahlinitého kationtu obklopeného 10 methansulfonátovými anionty v tris methansulfonátu hexaakvahlinitém ($[Al(H_2O)_6](CH_3O_3S)_3$)¹⁵³

Vznik chelatační vazby iontu kovu s hydroxidovými skupinami celulózy v polohách C6 na sousedních monomerních jednotkách glukózy (obr.33) se však zdá skutečně dosti nepravděpodobný.¹⁵⁴



Obr.33 Nepravděpodobný chelatační model soustavy barvivo – mořidlový kationt – bavlna¹⁵⁴

Simulace molekulární dynamiky interakce anthokyanu sambucinu a celulózy bez použití mořidla ukázala možnost vzniku několika vodíkových vazeb mezi barvivem a vláknem s délkou vazby kolem 192-218 pm. Délka vodíkové vazby ve vodě je cca 197 pm a je řádově 10x slabší než iontová nebo kovalentní vazba. Proto anthokyanu bez mořicí soli mohou bavlněný substrát velmi dobře obarvit, tato vazba však není příliš pevná (respektive záleží i na množství vodíkových vazeb), což se projeví špatnou stálostí v praní a většina barviva se z vlákna opět uvolní. Ne však zcela, a tak anthokyanu např. bavlněnou textilií spíše jen ušpiní, než kvalitně obarví.

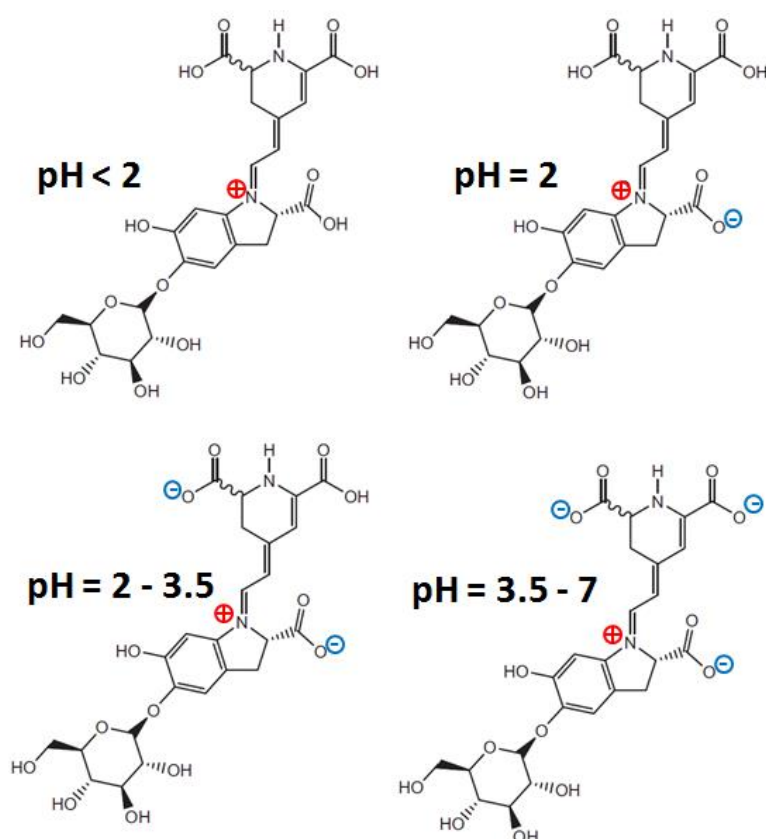
2.6.4 Barvení betalainy

Většina vědeckých prací věnovaných barvení betalainy se zabývá barvením vlny (případně polyakrylu¹⁵⁵) pomocí betalainů z plodů různých druhů opuncie.^{73, 26, 68, 72}

Tato barviva byla extrahována do vodní lázně, okyselené vodní lázně anebo vodní lázně s přidavkem ethanolu různě dlouhou dobu, od 5 minut při 80 °C⁷², až po dobu 1 hodiny při 90 °C v případě izolace žlutého indicaxanthinu⁷³, případně s použitím ultrazvuku při 45 °C po dobu 1 hodiny.^{26, 155} Většina autorů se shoduje na značné tepelné nestabilitě betalainů, např. po 2 hodinách při 90 °C degradovalo 90% červeného betaninu a 14% žlutého indicaxanthinu z plodů opuncie *Opuntia ficus – indica*.¹⁵⁶

Při extrakci betalainů nebo barvení betalainy je třeba udržovat nižší teplotu (kolem 60 °C), aby barva nedegradovala a nezhnědla.⁵⁰ Při dvoustupňovém barvení (1. extrakce barviva, 2. barvení tkaniny) uvádějí různí autoři jako optimální podmínky pro barvení vlny tímto extraktem dobu barvení v rozsahu 45 – 90 minut při teplotách 40 – 90 °C, a také bez ohledu na tepelnou nestabilitu betacyaninů dokonce až 1 hodinu při 100 °C⁷², přičemž hodnotícím kritériem je dosažená maximální K/S hodnota tkaniny v oblasti nejnižší reflektance.

To, v čem se však různí experimentátoři shodují, je vliv pH barvicí lázně na výslednou K/S hodnotu a sytost vybarvení tkaniny. Zdá se, alespoň u betaninů z plodů opuncí, že optimálním pH pro barvení vlny těmito barvivy je hodnota kolem 5^{72, 155} (resp. pH 4.5²⁶).



Obr.34 Změny elektrického náboje betaninu v různém pH

Tato hodnota vychází z chemické struktury betakyanů, které obsahují 3 karboxylové skupiny a také iminové a fenolové skupiny. Se změnou pH dochází ke změně náboje betalainu, v zásaditějším prostředí postupně disociují (deprotonizují) tři karboxylové skupiny barviva, v silně zásaditém prostředí disociuje navíc i fenolová skupina (HO-C6), v kyselějším prostředí ($\text{pH} < 2$) je tato disociace potlačena a dochází k protonizaci iminové skupiny (H-N16) (obr.34, podle¹⁵⁷). Postupně tak s rostoucím pH tedy vzniká kation ($\text{pH} < 2$), navenek neutrální zwitterion (amfoterní iont, tj. amfolyt v izoelektrickém bodu) ($\text{pH} = 2$), monoanion se dvěma disociovanými karboxyly ($\text{pH} 2\text{--}3.5$), dianion se třemi disociovanými karboxyly ($\text{pH} 3.5\text{--}7$), případně až trianion s disociací všech tří karboxylů a fenolové skupiny ($\text{pH} 7.5\text{--}9$). Zároveň je při pH 5 vlna maximálně protonizovaná (kladnými náboji na aminoskupinách), proto vzhledem k **iontovému charakteru vazby betalainu na vlnu** se při zhruba pH 5 váže na vlnu nejvíce barviva a K/S hodnota je nejvyšší. S rostoucím pH klesá stupeň protonizace vlny, s klesajícím pH zase klesá aniontový charakter betalainů a iontová vazba barvivo-vlna slábně.¹⁵⁶⁻¹⁵⁹

Někteří autoři používají k barvení betalainy vlnu předmořenou (např. kamenec, tanin, FeSO_4 , CuSO_4 , dichroman draselný,⁷² ale nejsytější vybarvení na vlně bylo pozorováno při použití manganatých a kobaltnatých solí (CoSO_4 , MnSO_4).⁷³

Nejpřekvapivější však je závěr většiny autorů, že světlostálost vlněné tkaniny obarvené betalainy je velmi dobrá (stupeň 3 až 5, někdy dokonce 6 a více^{26, 72} i u nepředmořených tkanin, a to i přes obecně známou nízkou světelnou stabilitu betalainů! Pouze při barvení indicaxanthinem autoři připouštějí špatnou světlostálost obarvené nenamořené tkaniny, která se mořením mírně zlepšila.⁷³

3. Antioxidační vlastnosti polyfenolů

Rostlinné polyfenoly jsou významnou skupinou antioxidantů. Jsou přirozenou součástí lidské potravy a jejich konzumace zvyšuje schopnost obrany organismu proti oxidačnímu stresu.

Reaktivní kyslíkaté sloučeniny (reactive oxygen species, ROS) jsou molekuly obsahující chemicky reaktivní kyslík. ROS zahrnují vedle radikálů i ionty kyslíku a peroxidy, a dále neradikálové chemikálie, jako jsou peroxid vodíku (H_2O_2), ozón (O_3), singletový kyslík, kyselina chlorná (HClO), dále alkyl hydroperoxydy, alkoxykupiny a alkylperoxyradikály ($\text{ROO}\cdot$).

ROS vznikají přirozeně v buňkách jako vedlejší produkt běžného aerobního metabolismu, ale k jejich dramatickému zvýšení dochází i vlivem chemicky a fyzikálně znečištěného prostředí. V průběhu mnohostupňového metabolického děje buněčného dýchání je přijatý kyslík postupně přeměněn na radikálový superoxidový aniont, peroxid vodíku, hydroxidový radikál a na konci řetězce vyloučen ve formě vody. Tento enzymatický děj však vykazuje i nerovnováhu, a tak se až 10% ROS dostává volně do buněčných struktur.¹⁶⁰ Přidáme-li extrémní zátěž z exogenně indukovaných ROS, dochází k selhávání přirozených ochranných mechanismů a vzniká tzv. oxidační stres. Ten je příčinou poškození buněk a zvýšeného výskytu degenerativních a nádorových onemocnění.

Volné kyslíkové radikály však nejsou jen škodlivé vedlejší produkty enzymatických reakcí dýchacího řetězce: v organismu plní i důležité imunitní funkce - např. leukocyty je aktivně tvoří v boji s mikroorganismy a ROS jsou také důležité při syntéze mediátorů zánětů, jako jsou leukotrieny, prostaglandiny nebo tromboxany.¹⁶¹

Lidský organismus je během života vystaven mnoha zátěžovým vlivům, součástí naší existence je fyzický i psychický stres, znečištěné životní prostředí, chemické látky (především aromatické uhlovodíky a ozón), a dále různé typy záření. Všechny tyto faktory neustále generují množství volných radikálů a reaktivních sloučenin, které atakují buněčné struktury na molekulární úrovni. Následkem jsou změny a poškození buněčných membrán, úseků DNA, tvorba abnormálních bílkovin, předčasné stárnutí a zánik buněk s celkovými patologickými důsledky. Tab.4 obsahuje přehled některých radikálů. Reaktivita ROS je vyjádřena poločasem jejich rozpadu a dle tabulky je zřejmé, že nejreaktivnější je hydroxylový radikál ($\text{HO}\cdot$) oproti relativně stabilnímu enzymaticky vznikajícímu peroxidu vodíku.¹⁶²

Tab.4 Poločas rozpadu některých ROS (podle ¹⁶²)

ROS	Chem.vzorec	Poločas rozpadu
Hydroxylový radikál	$\text{HO}\cdot$	10^{-9} s
Alkylový radikál	$\text{R}\cdot$	10^{-8} s
Alkoxylový radikál	$\text{RO}\cdot$	10^{-6} s
Peroxylový radikál	$\text{ROO}\cdot$	7 s
Superoxidový radikál	$\text{O}_2\cdot^-$	spontánní a enzymatický vznik
Peroxid vodíku	H_2O_2	ve vodném roztoku stabilní

Hydroxylový radikál je silně elektrofilní, má vysoký redukční potenciál (2 310 mV) a je tedy schopen abstrahovat vodík z aminokyselin, proteinů a dalších organických struktur o nižším redox potenciálu (čím vyšší je redox potenciál ROS, tím vyšší je jejich oxidační schopnost). Je například jediným volným radikálem, který reaguje se všemi čtyřmi dusíkatými bázemi v DNA, zatímco ostatní méně agresivní radikály reagují převážně s guaninem, nejnáze oxidovatelnou bází DNA.¹⁶³

Mezi biologické ochranné mechanismy před nebezpečnými ROS, kterými buňky disponují, patří různé enzymy (např. superoxid dismutáza, která přeměňuje superoxidový radikál na méně toxický peroxid vodíku nebo kataláza, která přeměňuje peroxid vodíku na vodu a kyslík).

Exogenními ochrannými látkami, které v buňkách pomáhají likvidovat nebezpečné kyslíkové radikály a další agresivní molekuly, jsou především antioxidační vitamíny (A, C a E) a antioxidační minerály (zinek, selen). Význam těchto exogenních antioxidantů roste se zvyšující se chemickou a fyzikální zátěží, protože reparační mechanismy buněk jsou omezené.

Příznivý vliv přírodních i syntetických antioxidantů na lidské zdraví a snižování rizika kardiovaskulárních a nádorových onemocnění byl sice již mnohokrát experimentálně prokázán, nicméně biologická dostupnost a léčebná účinnost antioxidantů a vztah mezi strukturou a aktivitou se značně liší. Bylo např. prokázáno in vivo i in vitro, že extrakt z révových semínek poskytuje výrazně lepší ochranu před peroxidací lipidů a poškozením DNA indukovanými volnými radikály, než vitamíny C, E a betakaroten.¹⁶⁴

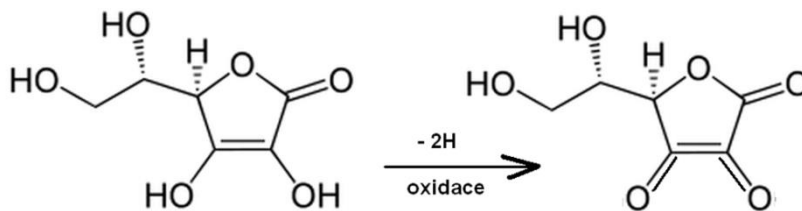
Blahodárné účinky proanthokyanidinů a flavonoidů jsou velmi intenzívně studovány,^{165, 166} nicméně je jen velmi málo známo o jejich mechanismu působení. Jejich protektivní účinek je patrně navozen kombinací několika faktorů, a to likvidací volných radikálů, chelatací přechodných kovů a inhibicí enzymů. Kromě toho hrají ochrannou roli proti peroxidaci lipidů a vzniku peroxydusitanů.¹⁶⁷

Díky silným antioxidačním schopnostem mají proanthokyanidiny (kondenzované taniny) extrahované z révových jadérek velký potenciál pro použití v nutraceutice¹⁶⁸ (antioxidanty jako potravní doplněk), v medicíně¹⁶⁹ (protizánětlivé účinky, likvidace rakovinných buněk¹⁷⁰) nebo v kosmetice: přídavek antioxidantů v opalovacích krémech likviduje volné radikály vznikající jednak atakem UV záření na kůži, jednak sám oxid titaničitý, který se jako látka chránící před UV zářením v této kosmetice často používá, generuje radikály, především singletový kyslík¹⁷¹ ve zvýšeném množství při záchytu UV záření.¹⁷²

Podle antioxidačního mechanismu se dělí **antioxidanty** na **primární**, které snižují aktivitu ROS tím, že poskytnou do reakce volný elektron a samy se změní na méně nebezpečný a stabilnější radikál, a na **sekundární** (reduktanty), které se samy oxidují a jinou látku redukují. Často se oxidují mechanismem dehydrogenace za vzniku karbonylové skupiny.

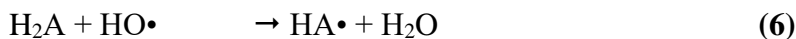
Mechanismus antioxidačního působení provitaminu A (β -karoten) se liší od jiných antioxidantů. ROS jsou zachyceny konjugovaným systémem β -karotenu za vzniku rezonancí stabilizovaného systému, následně dojde k rozštěpení a vzniku epoxidů, ketonů a neaktivních izomerů β -karotenu. β -karoten vykazuje podobně jako kyselina askorbová synergismus s tokoferoly, které ve směsi chrání před oxidací.^{173, 174}

Vitamíny E (tokoferoly) reagují s radikály za vzniku radikálů tokoferolů a následně se nevratně stabilizují reakcí s jinými radikály v systému. Se singletovým kyslíkem reagují za vzniku různých oxidačních produktů nebo jej zhášejí podobně jako β -karoten.¹⁷⁵

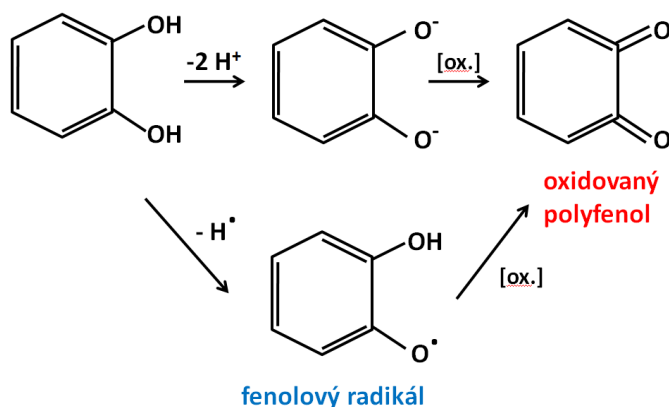


Obr.35 Oxidace kyseliny askorbové

Vitamín C (H_2A , kyselina askorbová), je také velmi silným antioxidantem. S kyslíkatými radikály reaguje za vzniku askorbylradikálu ($HA\cdot$), který se následně rozpadá na kyselinu askorbovou a dehydroaskorbovou (obr.35) podle reakcí (6) až (8)¹⁷³



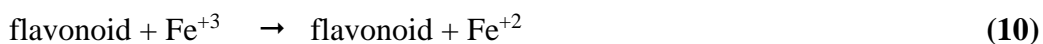
Antioxidační aktivita polyfenolů je složitý proces, který je kombinací různých mechanismů. O složitosti tohoto procesu svědčí i to, že od roku 1955 bylo publikováno asi 700 článků navrhuje různých in vivo a in vitro antioxidační mechanismy polyfenolů! Schopnost polyfenolů likvidovat volné radikály probíhá zjednodušeně podle schématu (9), kdy fenolová skupina polyfenolu reaguje se silně reaktivním radikálem, který „zháší“ a polyfenol sám se změní v radikál. Na obr.36 je zobrazen dvojitý mechanismus (dehydrogenační a radikálový) reakce flavonoidu nebo polyfenolu s hydroxylovými skupinami v orthopolohách. Výsledkem těchto interakcí jsou ve skutečnosti oxidace polyfenolů na různé složité chinoidní a semichinoidní struktury, v závislosti na pH a redox potenciálech těchto látek.



Obr.36 Dvojitý mechanismus oxidace polyfenolů

Některé polyfenoly mají vedle schopnosti vychytávat volné radikály i schopnost chelatovat kovy v závislosti na struktuře a na pH prostředí, jak bylo popsáno v kapitole 2.6.3 *Barvení anthokyany*. Speciálně u flavonoidů se předpokládá, že tento dvojitý účinek funguje při likvidaci volných radikálů synergicky, jednak přímou deaktivací RONS a jednak chelatací kovových iontů, které působí jako katalyzátory při vzniku radikálů. Předpokládá se, že toto je také jeden z protizánětlivých mechanismů flavonoidů. Např. lipofilní flavonoid kvercetin je schopen proniknout přes buněčnou membránu do buňky, kde blokuje enzymy cyklooxygenázu a lipooxygenázu, které jsou fyziologickým zdrojem RONS – kyslíkatých a dusíkatých radikálů, které v důsledku způsobují destrukci buněk a subbuněčných struktur. Ovšem ukazuje se, že blahodárný vliv antioxidantů nemusí být až tak jednoznačný. Za určitých podmínek se totiž tyto látky mohou změnit naopak v **prooxidanty** a destrukční efekt radikálů ještě prohloubit!

Tento prooxidační efekt vzniká právě v přítomnosti kovů (např. železo, měď). Některé polyfenoly totiž svou redukční silou redukují přítomné ionty Fe^{+3} na Fe^{+2} , což vede in vivo k zesílení Fentonovy reakce podle rovnic (10) až (12) a tím i k oxidačnímu stresu.^{4, 175, 176} Dochází k tomu především u flavonoidů s volným hydroxylem v poloze na C3 – nejprve dojde k odštěpení protonů, následně se z původní hydroxylové skupiny odštěpí i elektron a vzniká semichinon, přičemž odštěpený elektron redukuje iont Fe^{+3} na Fe^{+2} . Následuje odštěpení dalšího elektronu a semichinon se mění na chinon. Tento druhý elektron reaguje s kyslíkem za vzniku superoxidového aniontového radikálu $\text{O}_2^{\cdot-}$. Totéž proběhne u další molekuly flavonoidu a dva uvolněné elektrony reagují se vzniklým superoxidovým aniontovým radikálem za vzniku peroxidu kyslíku (Haber-Weissova reakce). Následuje Fentonova reakce peroxidu s Fe^{+2} a vzniká hydroxylový radikál.¹⁷⁷ Velké množství fenolových skupin, kyselé pH a přítomnost iontů železa, mědi aj. má tedy spíše prooxidační, proapoptotický efekt a tím ve svém důsledku i zvýšenou cytotoxicitu.



Již delší dobu probíhá také výzkum kardioprotektivního účinku flavonoidů: podání katecholaminu isoprenalinu navodí u potkanů morfologické a funkční změny kardiovaskulárního systému podobné akutnímu infarktu myokardu, přičemž je zkoumán vliv různých farmak na jeho průběh. A tak zatímco se někteří vědci snaží prokázat pozitivní kardioprotektivní efekt flavonoidů podaných ve vysokých dávkách laboratorním potkanům s cílem dokázat, že zvýšená chelatace kovových iontů minimalizuje poškození myokardu tak, že v něm zabrání enzymatickému průběhu Fentonovy reakce,^{178, 179} ukazuje se, že ve skutečnosti existuje úzké dávkovací rozmezí mezi anti- a prooxidačními vlastnostmi flavonoidů. Tak bylo např. zjištěno, že hydrofilní rutin (glykosylovaný kvercetin) podaný potkanům při infarktu myokardu intravenózně v dávce 11-46 mg/kg váhy průběh infarktu ještě zhoršoval a myokardiální poškození zvyšoval. Příčinou bylo patrně to, že chelatačním účinkem rutinu došlo k inaktivaci zinku a mědi, které jsou součástí fyziologických antioxidantních enzymů, což mělo za následek vyšší produkci RONS a v důsledku větší myokardiální poškození.¹⁸⁰ Je tedy jasné, že výzkum antioxidantních účinků polyfenolů přinese v budoucnu ještě zajímavá odhalení a nové poznatky o těchto látkách a jejich interakcích.

4. Antibakteriální vlastnosti polyfenolů

V souvislosti s nárůstem rezistence bakterií proti antibiotikům je výzkum veden nejen směrem k vývoji nových antibiotik, ale i k hledání jiných cest boje s infekcemi. Vývoj nových antibiotik totiž není v popředí zájmu farmaceutických firem – musíme si uvědomit, že vývoj nového antibiotika je velmi drahá záležitost a je zároveň jisté, že dříve nebo později i proti němu získají bakteriální kmeny odolnost. Navíc antibiotika jsou léčiva, která jsou užívána většinou pouze krátkodobě, a finanční zisk z nich není takový, jako z léků, které se užívají dlouhodobě, jako je to např. u léků proti vysokému tlaku. I když jsou stále ještě některá antibiotika rezervována pro závažné život ohrožující bakteriální sepse vyvolané velmi rezistentními kmeny, je možné, že se blíží doba, kdy medicína bude v tomto boji bezmocná. Zároveň se již ve světě objevují bakteriální kmeny odolné vůči všem dostupným antibiotikům (*Klebsiella pneumoniae* s genem pro tvorbu tzv. enzymu NDM-1, New Delhi metalo- β -laktamáza, který způsobuje tuto multirezistenci) a i když jde zatím jen o tzv. nozokomiální nákazy, navíc s případy, které prozatím pronikají do evropských nemocnic jen ojediněle, je pouze otázkou času, kdy tyto bakterie proniknou do komunit.¹⁸¹

Odborná literatura, která se zabývá antibakteriálními vlastnostmi polyfenolů, je velmi rozsáhlá, ale také často nejednotná pokud jde o účinnost, dávku a typ bakterie, proti které by měl daný polyfenol působit. Antibakteriální (ale i antivirové a antifungální) vlastnosti proti řadě G+ i G- kmenů jsou připisovány řadě polyfenolů obsažených v čaji¹⁸², ve víně¹⁸³, v ovoci¹⁸⁴, apod. Také antibakteriální účinky kyseliny tříslové, kyseliny gallové a kvercetin, které byly nejvíce používány k experimentům v této práci, jsou v odborné literatuře popisovány velmi často. Kyselina tříslová by měla být účinná např. proti bakteriím *Staphylococcus aureus*¹⁸⁵, *Clostridium perfringens*¹⁸⁶, *Helicobacter pylori*¹⁸⁷ nebo *Escherichia coli*.¹⁸⁸

Antibakteriální účinky kvercetin jsou popisovány především proti některým kmenům *S. aureus*, a to v kontaktu s bakteriemi v podobě roztoku¹⁸⁹ nebo jako součást kopolymerního scaffoldu PLGA.¹⁹⁰ Flavonoid kvercetin je silný antioxidant, in vitro u něj byly prokázány i protinádorové, protizánětlivé a protivirové účinky. Jeho protinádorové účinky vyplývají ze schopnosti inhibovat řadu enzymů (lipoxigenáza, cyklooxygenáza, Na-K-ATPáza, různé kinázy) a tak prostřednictvím několika biochemických mechanismů (inhibice syntézy nukleových kyselin, narušení funkce cytoplazmatické membrány, zásah do energetického metabolismu buňky) chrání před tvorbou nádorů a zastavuje proliferaci buněk v různě transformovaných buněčných liniích in vitro (lidský adenokarcinom, promyelocytární leukémie, karcinom tlustého střeva, myši hepatom aj.). Podobnými biochemickými mechanismy může zároveň inhibovat i růst bakterií.¹⁹¹

Flavonoid baicalein (5,6,7- trihydroxyflavon) obsažený v kořenech tradiční čínské léčivé rostliny *Scutellaria baicalensis* má kromě silných antioxidačních a prokazatelně protinádorových a protizánětlivých účinků také velmi silný antibakteriální efekt proti řadě bakterií a střevních patogenů, např. proti původci cholery (*Vibrio cholerae*) a zároveň snižuje tvorbu prozánětlivých cytokinů v buňkách střevního epitelu, které byly infikovány cholerovými toxiny vibria.¹⁹²

Kyselina tříslová a gallová se velmi silně váží na proteiny a enzymy pomocí vodíkových vazeb, což je jeden z možných mechanismů jejich účinku proti mikroorganismům.¹⁹³ Tento efekt byl pozorován při testování kyseliny tříslové, gallové a katechinů na velmi odolné bakterii MRSA (methicillin-rezistentní *Staphylococcus aureus*). Jedním z virulentních faktorů zlatého stafylokoka, který jej odlišuje od jiných stafylokoků, je tvorba tzv. volné nebo na bakteriální stěnu vázané plazmakoagulázy, díky které má *S. aureus* schopnost tvorby fibrinu z plazmatického fibrinogenu. Důsledkem je jakési ochranné pouzdro (fibrinový biofilm) kolem

samotné bakterie nebo ložiska infekce, které silně znesnadňuje jak průnik antibiotik, tak i průnik makrofágů. *S. aureus* vyvolává nejčastěji tvorbu kožních furunklů, kožních i tkáňových abscesů a lokalizované infekce měkkých tkání, ale i osteomyelitidu, mastitidu, nekrotizující pneumonie, endokarditidu, syndrom toxického šoku a sepse.¹⁹⁴ Ukazuje se, že se zde uplatňuje schopnost taninů tvořit komplexy s bílkovinami, protože kyselina tříslová toto ochranné pouzdro bakterie inaktivuje, čím zpřístupní bakterii pro kontakt s antibiotikem. Např. při použití kyseliny tříslové (v koncentraci 100 mg/litr) spolu s antibiotikem byly všechny testované bakteriální vzorky inhibovány již nejnižší koncentrací antibiotika (0.06 mg/litr), bez použití kyseliny tříslové bylo dosaženo inhibice při koncentracích antibiotika až od 0.25 do 128 mg/litr.⁶

Železo a další stopové prvky jsou nezbytné především pro metabolismus aerobních mikrobů a proto je další mechanismus antibakteriálního účinku polyfenolů vysvětlován chelatací železa z prostředí (in vivo z krevní plazmy), která tento důležitý mikronutrient učiní pro bakterie nedostupnou. Zdá se, že tento mechanismus je silnější u polyfenolů, které mají na kruhu B tři fenolické skupiny (3,4,5- trihydroxy benzoyl) a tyto mají také větší antibakteriální účinnost než polyfenoly s jejich nižším počtem.

I kyselina tříslová má značnou schopnost tvořit komplexy s železem obsaženým v krevní plazmě, čímž jej činí nedostupným pro mikroorganismy. Byl však prokázán její inhibiční efekt i na růst anaerobních (především střevních) bakterií rodu *Clostridium*. Studie¹⁸⁶ zaměřená na účinek taninů z kebrača (kondenzované taniny) a kaštanů (hydrolyzovatelné taniny) na inhibici růstu patogenního kmene *Clostridium perfringens* a na potlačení tvorby jeho toxinů prokázala antibakteriální efekt kondenzovaných a hydrolyzovatelných taninů u hospodářských zvířat. Kondenzované taniny nejsou ve střevě tak snadno odbouratelné jako taniny hydrolyzovatelné a zdá se, že vyvážený poměr obou v krmných směsích má určitý synergický efekt. V souvislosti se silícím tlakem na nutnost omezit podávání antibiotik hospodářským zvířatům lze předpokládat zvýšení jejich nemocnosti a zvýšení počtu infekcí trávicího ústrojí vyvolávaných střevními patogeny. Proto je věnována značná pozornost výzkumu alternativních možností omezení chorob hospodářských zvířat, přičemž taniny jsou jednou z možností.

Podobný účinek na střevní patogeny mají i další taniny, katechiny obsažené v zeleném čaji. Čínské a japonské studie jsou často zaměřeny za výzkum blahodárných účinků čajů na lidské zdraví. Jedna z nich např. zkoumala vliv těchto látek na složení lidské střevní mikroflóry.⁸ Čtyři týdny každodenní konzumace katechinů, které představovaly ekvivalent 10 šálků silného zeleného čaje, vedly k výraznému omezení klostridií ve střevní flóře, přičemž ale množství ostatních bakterií (např. rodu *Bacteroides*) nebylo významně ovlivněno. K návratu k původnímu stavu pak došlo do 2 týdnů od přerušení příjmu těchto látek.

Antibakteriální účinek polyfenolů je tedy, jak se zdá, opět složitou kombinací několika mechanismů - vazba s bílkovinami a jejich inaktivace, chelatace kovových iontů, přímé ovlivnění biochemických drah v buňkách včetně inhibice některých enzymů a vyvolání apoptotického efektu u bakterií. Prolínají se tak chelatační, antioxidační a někdy i prooxidační účinky s účinky antibiotickými, přičemž podobně jako u syntetických a polysyntetických antibiotik je jejich účinnost podmíněna řadou dalších faktorů, kromě faktorů rezistence konkrétního bakteriálního kmene např. i koncentrací a dostupností látky v místě účinku.

5. UV protektivní vlastnosti polyfenolů

Ultrafialové (UV) záření je součástí slunečního záření dopadajícího na zemský povrch. Jedná se o elektromagnetické vlnění s kratší vlnovou délkou a s vyšší energií, než je vlnová délka a energie fotonů viditelného světla.

99% UV záření, které projde zemskou atmosférou, je tvořeno tzv. UVA zářením, (vlnová délka přibližně v rozsahu 315-400 nm). UVA proniká ve větší míře do kůže, kde působí poškození především při dlouhodobé expozici. Zarudnutí kůže a stimulace pigmentace kůže probíhá s mnohem nižší intenzitou, než u záření UVB. Naprostá většina UVB záření (vlnová délka v rozmezí 280-315 nm) je zachycena ve stratosféře ozónovou vrstvou. Malá část, která dopadne na zemský povrch, případně UVB, které projde atmosférou při zeslabené ozónové vrstvě, proniká sice do pokožky méně, ale zato zde působí s velkou efektivitou. Je zodpovědné za vyvolání erytému (zarudnutí kůže), stimulaci tvorby kožního pigmentu (melanin), poškození zraku (likvidace tyčinek a čípků v oku), narušení DNA i bílkovinných struktur v buňkách a v konečném důsledku za stárnutí kůže (fotoageing) a zvýšený výskyt rakoviny kůže. Základní ochranu před škodlivým vlivem UV záření tak představují ochranné brýle, opalovací krémy a především zakrytí těla vhodnou textilií.

Předpokládá se, že některá rostlinná barviva (především flavonoidy a karotenoidy) mají kromě důležité úlohy při opylení a rozmnožování rostlin za úkol především ochranu rostlinných pletiv před nebezpečným UV zářením. Rezonanční systém konjugovaných dvojných vazeb těchto sloučenin je schopen krátkovlnné UV záření absorbovat, a protože jsou to také lapače volných radikálů, jsou schopny vzniklé radikály zároveň eliminovat. Je prokázáno, že změny buněčného redox potenciálu aktivují u rostlin transkripční faktory, které regulují biosyntézu flavonoidů a následně i anthokyanů. Zvýšený stres (nutriční, teplotní, světelný) vede u řady rostlin ke zvýšené tvorbě ROS. Především zvýšený světelný stres vede u rostlin ke zvýšené tvorbě singletového kyslíku a následně peroxidu vodíku v chloroplastech a úniku nebezpečného H₂O₂ do tkání. Při vyčerpání jiných tkáňových antioxidačních mechanismů (např. vakuolární peroxidázy – askorbát peroxidáza) pak nastupují flavonoidy jako účinné lapače a deaktivátory ROS.

Flavonoidy jsou totiž lokalizovány jak v povrchových částech rostlin (stěny a vakuoly epidermálních buněk), tak i uvnitř listů včetně mezofylu, blízkosti buněčného jádra, v chloroplastech a ve vakuolách. Zvýšený přísun UV záření prokazatelně zvyšuje biosyntézu dihydroxyflavonoidních substituentů na kruhu B, jako jsou luteolin-7-o- glykosidy a kvercetin-3-o-glykosidy. Proti tomu monohydroxyderiváty (např. glykosidy apigeninu a kampferolu) převládají v rostlinách, které rostou ve stínu. Z toho lze vyvozovat, že dihydroxyderivované flavonoidy hrají významnou roli v ochraně rostlinných pletiv před UV-B zářením.^{195, 196}

Flavonoidy a karotenoidy jsou látky, které se jako mikronutrienty v lidské potravě dostávají do tkání, které jsou světelně exponovány (oči a kůže) a i zde mohou působit fotoprotektivně.¹⁹⁷ Probíhá i výzkum topického působení těchto látek proti fotooxidativnímu poškození kůže, např. u extraktu z janovce metlatého (*Cytisus scoparius*).¹⁹⁸ Také kvercetin a rutin jsou testovány jako látky chránící před UV-A a UV-B zářením s možným lokálním použitím do opalovacích krémů.¹⁹⁹

Jak bylo popsáno v kapitole 3 *Antioxidační vlastnosti polyfenolů*, mechanismus eliminace ROS je u flavonoidů a karotenoidů poněkud odlišný, ale zároveň mohou tyto látky fungovat při eliminaci UV záření synergicky. Lze tedy předpokládat, že UV protektivní účinek tkaniny obarvené přírodními barvivy – anthokyany, flavonoidy či karotenoidy, by měl být také kombinací více faktorů – absorpce UV záření a eliminace vznikajících radikálů.

6. Technické aplikace polyfenolů

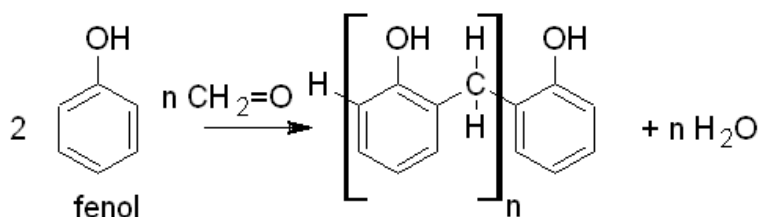
I v jiných než barvířských aplikacích lze využít některé základní vlastnosti polyfenolů – antioxidační účinky, schopnost likvidovat volné radikály, schopnost tvořit komplexy s ionty kovů nebo koagulovat bílkoviny. K těmto účelům jsou používány především taniny.

6.1 Vyčiňování kůží

Kůže a kožešiny byly zpracovávány a čištěny už od pravěku, ale specializované povolání koželuhů se objevuje až ve středověku. Kůže a kožešiny se nejprve nahrubo mechanicky očistily, máčely a dále zpracovávaly pomocí hlinitých solí nebo tříslovin (taninů) ze stromové kůry, přičemž se využívalo právě jejich schopnosti srážet bílkoviny a odstraňovat tak měkké tkáně na kůži, které by jinak podléhaly zkáze.

6.2 Výroba pryskyřic a stavebních materiálů

Polykondenzační reakce fenolu a formaldehydu – výroba fenolformaldehydové pryskyřice (obr.37) - je známa už od počátku 20. století. V r. 1907 připravil belgický chemik Leo Baekeland první průmyslově vyráběnou umělou hmotu – bakelit. Tento reaktoplast se díky své pevnosti, izolačním schopnostem i ohnivzdornosti velmi rychle rozšířil v podobě elektrospotřebičů, kuchyňských přístrojů i elektroinstalačního materiálu a stal se základem velké skupiny fenoplastů, které nacházejí dodnes své použití v elektrotechnice, stavebnictví i v běžném životě.



Obr.37 Fenolformaldehydová pryskyřice²⁰⁰

Zejména rozvojové země musí řešit rostoucí poptávku po stavebních materiálech v důsledku rychle se rozvíjejících měst. Rostoucí náklady na dřevo a dřevařské výrobky spolu se zájmem o zachování lesů představují obtížné dilema pro většinu obyvatel. Velký potenciál pro výrobu dřevotřískových desek nahrazujících dřevařské výrobky představuje ročně desetitisíce tun zemědělských odpadů (rýžové plevy, slupky z kávových zrn, kokosová vlákna, sisal, kukuřičné klasy apod.), ovšem tento potenciál zůstává nevyužitý, protože k výrobě dřevotřísek jsou potřebné pryskyřice a lepidla, která jsou drahá a je nutné je dovážet. Proto vědci pracují na využití místních přírodních zdrojů, kterými by nahradili syntetické pryskyřice. Především v Jižní Americe, Austrálii a Jižní Africe byla vyvinuta nová lepidla a pryskyřice na bázi taninů, která svými vlastnostmi (odolnost proti vlhku, pevnost) předčí tradiční syntetické fenolformaldehydové pryskyřice.

Hlavními komponentami při výrobě taninových pryskyřic a lepidel jsou kromě taninů z kůry různých stromů hydroxid sodný, kyselina octová, močovina a formaldehyd, (pryskyřice pro venkovní aplikace se vyrábí spojením taninů s diisokyanáty) a proto je při

jejich vývoji brán zřetel i k minimalizaci uvolňování formaldehydu a dalších toxických látek.²⁰¹

I u již zmiňovaných výlisků z produkce červeného vína se hledají další možnosti jejich zužitkování. Někteří vědci zkoumají možnost využití vinařských odpadů jako zdroje taninů pro výrobu lepidel a pryskyřic.^{202, 203}

6.3 Výroba protikoročních nátěrů

Antikoroční přípravky zabraňují oxidaci kovu jednak vytvořením adhezní vrstvy, která brání kontaktu kovu se vzduchem a vodou a jednak aktivní antioxidační aktivitou. Tradiční antikoroční pigmenty jako je olovo nebo chrom představují ekologická rizika a proto jsou zkoumány i jiné alternativy. Taniny jsou již několik let komerčně využívaným aditivem v antikoročních směsích (např. taniny z borovice nebo akácie) a mnohé studie se zabývají jejich ochranným mechanismem. Podle některých podporují taniny vznik magnetitu na kovovém rozhraní a reakcí s již vznikající rzi za vzniku amorfního tanátu železitého je aktivní rez převáděna na stabilnější a vůči korozi odolnější sloučeniny, ovšem přesný mechanismus antikoročního účinku taninů není ještě přesně prostudován.^{204, 205}

6.4 Odstraňování kovových iontů z vody

Konvenčními technikami, které se používají ke snížení obsahu iontů kovů v průmyslových odpadech, jsou chemické srážení, iontová výměna, membránová filtrace, reverzní osmóza a elektrolytické metody. Tyto metody však mají svá omezení (pH, vysoké náklady, účinnost). Taniny by mohly být používány jako poměrně levná a efektivní alternativa pro odstraňování kovových iontů z roztoků. Vzhledem k rozpustnosti taninů ve vodě je však potřeba vyřešit jejich imobilizaci a umístění na nerozpustných nosičích nebo vytvoření adsorpčního taninového gelu.

Některé studie se zabývají přímo využitím kůry stromů, případně jiných částí rostlin (např. ořechových skořápek²⁰⁶) bohatých na obsah taninů jako absorbentů těžkých kovů z vody,^{207, 208} jiné řeší tuto problematiku pomocí sorpce na uhlíkový materiál získaný pyrolýzou dřeva a kůry.

Některé studie se zabývají odstraněním a rekuperací iontů z vody navázáním na nerozpustný taninový gel, který je připraven z rostlinných hydrolyzovatelných taninů zesíťováním pomocí vodného roztoku čpavku a formaldehydu. Takto je studována např. sorpce měďnatých iontů²⁰⁹, sorpce toxického šestimocného chromu se současnou redukcí na trojmocný chrom na taninovém gelu z kondenzovaných taninů z mimózy²¹⁰, sorpce uranového kationu UO_2^{+2} na gel připravený z kondenzovaných taninů z kůry voskovníku, který byl imobilizován na membráně z kolagenních vláken²¹¹, apod. Podobných prací sledujících např. adsorpci palladia, zlata, kadmia, americia nebo thoria na taninový sorbent je celá řada, ovšem vzhledem k životnímu prostředí je zde sporné právě použití formaldehydu jako síťovacího prostředku.

6.5 Odstranění zápachu ze surové vlny

V posledních letech u nás roste zájem o chov ovcí. Především drobní chovatelé v naší zemi však narážejí na zásadní problém, kterým je absence podniků vykupujících a zpracovávajících surovou vlnu. Vlnářský průmysl u nás již mnoho let zpracovává kvalitní pranou importovanou vlnu, dováží se však i praná vlna pro technické aplikace, jako je tepelná a akustická izolace ve stavebnictví či automobilovém průmyslu.

Klasické praní potní vlny pro textilní průmysl je záležitost značně zatěžující životní prostředí, využití surové vlny zase brání její zápach a neošetřená vlna je navíc náchylná k napadení škůdci. Za typický zápach jsou zodpovědné těkavé látky, jako ethanol, aceton, toluen, propanol a dále také sirné těkavé látky jako jsou sirouhlik, karbonylsulfid a dimethylsulfid. Předpokládá se, že tyto látky se uvolňují z vlněného vlákna (z proteinů i z lipidů) působením volných radikálů, jejichž tvorba roste s teplotou.²¹² K ošetření prané vlny pro izolační účely by mohl být použit místo syntetických antioxidantů a repelentů např. levný surový extrakt z drceného odpadního dřeva a kůry stromů s vysokým obsahem taninů, které by zabránily tvorbě volných radikálů a zároveň by tvořily impregnační ochranu před škůdci.

6.6 Tvorba nanočástic kovů

Nanotechnologie jsou hitem posledních let. Kovové nanočástice nacházejí uplatnění v různých oblastech, jako jsou biosenzory, aditiva pro zlepšení tepelné a elektrické vodivosti, fotokatalyzátory, antimikrobiální povrchy, atd. Tyto materiály mohou být připraveny fyzikální, chemickou nebo biogenní cestou a zároveň jejich velikost, složení a stabilita může být ovlivněna změnou reakčních podmínek. Redukce kovových nanočástic z iontových roztoků pomocí taninů a dalších polyfenolů nebo jiných antioxidantů je jednou z mnoha možností této "zelené" syntézy.²¹³⁻²¹⁶ Tyto metody přípravy jsou velmi šetrné k životnímu prostředí. Nanočásticemi lze funkcionalizovat i textilie, například k dosažení antibakteriálních vlastností^{209, 217}, hydrofobizace povrchu vláken a ochrany před UV zářením²¹⁸, nanočásticemi stříbra na vláknech lze dosáhnout zvýšení vodivosti vláken²¹⁹ nebo dokonce lze takto vlákna barvit, např. nanočásticemi stříbra²²⁰ či zlata²²¹.

6.7 Vazba taninů s některými syntetickými polymery

Mezi taniny a některými syntetickými polymery, jako je polyvinyl pyrrolidon (PVP) nebo polyetylen glykol (PEG), vznikají silné vazby. Tyto polymery obsahují v řetězci molekuly kyslíku, se kterými polyfenoly tvoří vodíkové můstky.²²²

Taniny mají značnou afinitu také k polyamidu, i zde se uplatňují vodíkové vazby na peptidy. Tyto vazby by dle literatury měly být stabilní a nezávislé na pH systému v rozmezí 2-8. Při vyšším pH jsou již fenolické skupiny ionizovány, takže je k dispozici méně vodíkových vazeb a fixace taninů na peptidické vazby rychle slábne.²²³ Silné afinity taninů k polyamidu se využívá např. k přečišťování rostlinných extraktů (odstranění taninů) polyamidem^{224, 225} a dále v potravinářství k úpravě ovocných šťáv (odstraněním taninů se odstraňuje jejich trpkost).²²⁶

7. Biomedicínské aplikace polyfenolů

Tkáňové inženýrství je interdisciplinární obor, který spojuje technické postupy, materiálové inženýrství, biologii a medicínu při vývoji náhrad tkání a orgánů.

Arteficiální nosiče musí splňovat řadu podmínek - biokompatibilitu, přátelské prostředí pro adhezi, proliferaci a diferenciaci buněk, přiměřenou pevnost současně se značnou porozitou, často též regulovatelnou životnost v případě perspektivy postupného nahrazení umělé tkáně plnohodnotnou vlastní tkání, a tedy i biodegradabilitu a v ideálním případě též bioresorbovatelnost.

Ze stovek známých materiálů, především polymerů a kovů, se v tomto přísném výběru pro nosiče osvědčilo jen malé procento materiálů. Pro žádnou nahrazovanou tkáň však zatím neexistuje ideální nosič a všechny arteficiální nosiče jsou dosud spíše kompromisem v požadovaných vlastnostech. Je potřeba kombinovat více materiálů a metod, abychom ve snaze napodobit přírodu dosáhli biologicky akceptovatelné reparace tkáně či orgánu, a to především při síťování přírodních polymerů ke zvýšení pevnosti a enzymatické odolnosti nosiče.

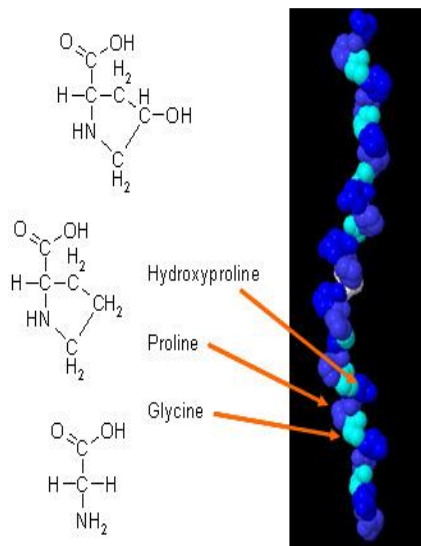
7.1 Síťování kolagenu

Kolagen (obr.38) je vláknitá bílkovina. Zesíťováním kolagenu prostřednictvím příčných vazeb (vodíkových můstků) lze zvýšit jeho pevnost, tepelnou stabilitu a odolnost vůči enzymatické degradaci. K síťování lze použít syntetická síťovadla s reaktivními skupinami - aldehydy, kyanáty, fenoly (např. glutaraldehyd, hexametylen diizokyanát), jako síťovací prostředek však může sloužit i přírodní polyfenol (katechin, kyselina tříslová), neboť se zde uplatňují patrně stejné vazebné systémy, jako mezi polyfenoly a syntetickými polymery.¹²³

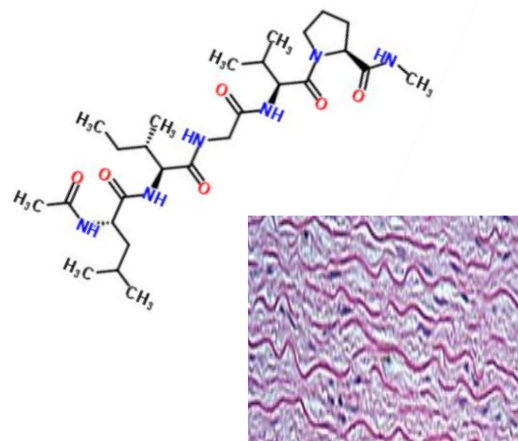
Kondenzované taniny (proanthokyanidiny) jsou zcela neprávem zkoumány spíše okrajově, přestože ve srovnání s hydrolyzovatelnými taniny prokazatelně nevykazují akutní ani subakutní toxicitu a zároveň mají mnoho výhodných biologických vlastností (působí protizánětlivě, protitromboticky, myorelaxačně) a současně si zachovávají vlastnosti typické pro polyfenolické látky (antioxidační, antiradikálové, koagulační, komplexační, antimikrobiální a antivirové).

Některé pilotní studie využívají jejich nízké toxicity pro vývoj stomatologických náhrad a výplní (síťování kolagenu v dentinové matrix^{227, 228}), další ojedinělé studie zjišťovaly jejich možné použití při síťování xenotransplantátů (např. decelularizovaných chlopní) z prasete, podobně, jako byly testovány hydrolyzovatelné taniny.

Onemocnění srdečních chlopní mají vysokou úmrtnost a nedostatek dárců vede k používání mechanických náhrad, které jsou však vysoce trombogenní a jejich transplantace znamená nutnost doživotní antikoagulační léčby. Proti tomu mají xenogenní náhrady, jako jsou decelularizované prasečí chlopně, nesporné výhody - neomezený zdroj dárců, výborné hemodynamické vlastnosti a méně trombotických komplikací. Zásadním problémem je ale jejich malá odolnost, rychlá degradace vlivem enzymatické hydrolýzy a kalcifikace, kterou částečně řeší síťování glutaraldehydem. Ukázalo se, že prasečí chlopní matrice síťovaná prokyanidinem vykazuje mnohem vyšší pevnost v tahu při zachování pružnosti, dále výbornou odolnost vůči enzymatické hydrolýze a po 6 týdnech podkožní implantace potkanům nebyla patrná žádná známka kalcifikace ve srovnání se stejným nosičem síťovaným glutaraldehydem. Také uvolňované prokyanidiny vykazovaly ve srovnání s glutaraldehydem síťovaným materiálem 100x nižší cytotoxicitu vůči testovaným bovinním aortálním intersticiálním buňkám.^{229, 230}



Obr.38 Kolagen²³¹



Obr.39 Elastin²³²

7.2 Síťování elastinu

Jak již bylo zmíněno, běžným síťovacím prostředkem v inženýrství cévních náhrad je glutaraldehyd, který se používá především k síťování kolagenu. Problémem ale je, že glutaraldehyd nesíťuje elastin (obr.39), který je důležitou složkou stěny cévních implantátů (větší cévy a aorta) a který tvoří cípy srdečních chlopní. Elastin totiž na rozdíl od kolagenu obsahuje jen velmi málo volných reaktivních aminoskupin, které se síťování s glutaraldehydem účastní.

V případě velkých cév a srdečních chlopní jde především o xenogenní implantáty, jejichž nežádoucí enzymatická hydrolýza přináší v průběhu 5-10 let kromě progresivní degradace implantátu i toxicitu.²³³

Pokusy s xenogenními nosiči na zvířecích modelech (decelularizovaná prasečí aorta a chlopně implantované potkanům) ukazují, že elastin v nosičích ošetřených pouze glutaraldehydem velmi rychle podléhá kalcifikaci a degradačnímu účinku proteolytických enzymů.⁵² Bylo zjištěno, že kyselina třísllová na rozdíl od glutaraldehydu elastin velmi efektivně síťuje, navíc má výhodné antimikrobiální vlastnosti, inhibuje degradační enzymy a snižuje antigenicitu nosiče.^{234, 235}

7.3 Léčba popálenin

Použití kyseliny tříslové při léčbě popálenin 2. a 3. stupně bylo poprvé popsáno v roce 1925 Davidsonem.²³⁶ Doporučovaný postup byl nanášení 5% roztoku kyseliny tříslové sprejem na popáleniny, a to každých 15 minut, dokud vznikající koagulum nezískalo tmavě mahagonovou barvu²³⁷ (obr.40). Komplexotvorné a síťovací vlastnosti kyseliny tříslové, která tvoří s proteiny vodíkové vazby, vedou nejen k rychlému uzavření rány vytvořením pružné suché vrstvy, čímž se sníží únik plazmy a snižuje se riziko průniku infekce, ale zároveň tanin koagulačně imobilizuje popáleninové toxiny, které vznikají tepelnou denaturací tkáňových bílkovin a snižuje tak jejich průnik do krevního oběhu a tak i nebezpečí rozvoje popáleninového hepatotoxického šoku (toxémie). Rychlé uzavření rány také minimalizovalo nebezpečí sekundární infekce a některé postupy byly navíc kvůli zvýšení antimikrobiálního efektu doplněny přidáním 10% dusičnanu stříbrného. Nicméně od této metody se upustilo v r. 1943 z důvodu hlášené hepatotoxicity kyseliny tříslové.



Obr.40 Léčba popálenin Tannafaxem (léčivý gel tanin + 0,5% fenol)²³⁸

Na druhé straně bylo obtížné vysvětlit údajnou hepatotoxicitu kyseliny tříslové a zároveň výrazný pokles úmrtnosti na popáleniny (z 35.2 na 11.8 %), kterého bylo dosaženo od zavedení léčby popálenin kyselinou tříslovou. Popisy pacientů se žloutenkou, která se u nich rozvinula po léčbě taninem, mohly spíše souviset v té době s nedostatečnými znalostmi o sepsi a orgánových selháních a možná také s čistotou a různorodým složením léčebného prostředku.²³⁷

Je třeba si také uvědomit, že v r. 1941, kdy se v německém lékopisu (*German Pharmacopeia*) objevila první oficiální specifikace taninu, byla čistota tohoto produktu jen 35%, zatímco od r. 1988 obsah kyseliny tříslové v komerčním léčivu překročil 98%.²³⁹ Vzhledem k těmto protichůdným zprávám v literatuře a vyšší čistotě kyseliny tříslové je tato metoda dnes opět přehodnocována.

Nejasnosti jsou také kolem typů taninů používaných k léčbě. V r. 1920 se sice objevuje první rozčlenění taninů na hydrolyzovatelné a kondenzované, ovšem přesnější specifikace a objasnění struktury přichází až po r. 1950 s rozvojem chromatografických technik. Davidson vycházel z čínské medicíny a používal taniny z rostliny *Galla chinensis* (*Rhus chinensis*, škumpa černá/škumpa čínská), která obsahuje kyselinu gallovou a gallotaniny, které byly v té době označeny jako "medicínální tanin".²³⁶ Později bylo prokázáno, že gallotaniny (hydrolyzovatelné taniny) jsou skutečně mnohem toxičtější než taniny kondenzované,

především díky uvolňování jejich stavebního monomeru kyseliny gallové.²³⁹ Ovšem většina z experimentálních důkazů proti dříve používané kyselině tříslivé byla založena na 10% a vyšší koncentraci podávané v podkožních injekcích laboratorním zvířatům, přičemž v klinické praxi se používala maximálně 5% koncentrace. A do jaké míry přispěly k rozvoji jaterní nekrózy sepse, hypovolemický šok nebo resorpce popáleninových toxinů, zůstává zatím nezodpovězeno.^{236, 237}

Hepatotoxicitou kyseliny tříslivé při léčbě popálenin se zabývá zajímavá novodobá studie²³⁹, ve které byly měřeny hladiny sérových transamináz a alkalických fosfatáz, které sérologicky indikují jaterní léze a hepatocelulární nekrózy. Klinická studie zkoumala pacienty s popáleninami 2. a 3. stupně, které byly ošetřovány lokálně vysoce čistou kyselinou tříslivou (99,5% poly-galloylglukóza s obsahem kyseliny gallové pod 0,1%), ze které byla připravena 7,5% mast, která byla denně aplikována na popáleniny v rozsahu 10% tělního povrchu. Vysoce čistý produkt tak zajišťoval minimální obsah volné toxické kyseliny gallové – monomerního trifenolu, který je stavebním monomerem hydrolyzovatelných taninů.

U pacientů byla v průběhu 5-15 dnů měřena hladina sérových enzymů indikujících poškození jaterní tkáně: gama-glutamyl transferáza (GGT), alkalická fosfatáza (AP), aspartát aminotransferáza (AST), alanin aminotransferáza (ALT). Ačkoliv žádný z pacientů nevykazoval klinické příznaky žloutenky, došlo u všech popálených k přechodnému mírnému zvýšení všech těchto hodnot. Ovšem v tomto dočasném zvýšení aktivity sérových enzymů nebyl prokázán žádný statisticky významný rozdíl mezi skupinou pacientů léčených kyselinou tříslivou a kontrolním vzorkem pacientů, kteří jí léčeni nebyli. Proto lze předpokládat, že k zvýšení hladiny transamináz a alkalických fosfatáz došlo u pacientů v důsledku popáleninových toxinů a nikoliv v důsledku léčby taninem, alespoň pokud šlo o léčení popálenin v rozsahu 10% povrchu těla.

K jednoznačnějšímu závěru, který by dal jasnou odpověď ohledně širokého použití kyseliny tříslivé k léčbě popálenin, by bylo potřeba provést další toxikologický výzkum, provést klinické studie s léčbou popálenin kyselinou tříslivou na větší tělní ploše a také provést srovnávací studie s jinými v současnosti používanými metodami ošetřování popálenin.²⁴⁰

7.4 Hojení ran

Kožní hojení ran je složitý proces, který se skládá z progresu zánětu, angiogeneze, ukládání kolagenu, reepitelizace a tkáňové remodelace. Organismus se v procesu hojení rány snaží odolat vstupu patogenů, obnovit integritu poškozené tkáně a rekonstruovat fyziologickou funkci pokožky.²⁴¹

Některé studie prováděné in vivo např. na potkanech poukazují na uspokojivé výsledky s použitím taninů a extraktů z různých rostlin, často používaných v lidovém léčitelství, při hojení ran. Jejich hojivý účinek vychází pravděpodobně jednak z antimikrobiální a jednak z angiogenní aktivity polyfenolů. Například taniny kromě přímého antibakteriálního účinku snižují propustnost kapilár v ráně, čímž se redukuje otok a exsudace, což vede k rychlému vzniku strupů. To zamezí dalšímu vstupu mikrobů a šíření infekce.

Pro hojení rány je zásadní novotvorba kapilár, která probíhá v granulační tkáni vlivem růstových faktorů stimulujících endotelové buňky. Předpokládá se, že taniny z rostlinných extraktů stimulují tvorbu těchto růstových faktorů a tím zároveň stimulují angiogenezi.²⁴²

Taniny podporují uzavření rány patrně i pomocí dalších mechanismů, jako je stimulace fibroblastů²⁴³, likvidace nadbytku volných radikálů a reaktivních sloučenin kyslíku a podporou kontrakce rány. Vývoj rány může negativně ovlivnit především bakteriální infekce. Bakterie infikující ránu tvoří proteolytické enzymy, které působí nekrózu tkáně a její zkapalnění, což dále podporuje růst bakterií. Původně žádoucí reparační zánět tak může s rozvojem infekce a sepse přejít v zánět destruktivní a vzniká nehojící se chronická rána. Chronickou ránu často kolonizují bakteriální kmeny rodu *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Clostridium* a *Pseudomonas*²⁴⁴. Taniny spolu s dalšími polyfenoly z rostlinných extraktů mohou působit hojivě právě díky antibakteriální činnosti, stimulaci angiogeneze, fibroblastů, případně schopností tlumit zánět.²⁴⁵⁻²⁴⁷

8. Použité a studované materiály

8.1 Zdroje rostlinných polyfenolů použité k experimentům

Kyselina třísllová, 1701 g/mol (puriss., Sigma-Aldrich)

Směs kondenzovaných taninů (proanthokyanidiny) „Tannin Grape“ (Erbslöh)

Kyselina gallová, monohydrát, 170 g/mol (ACS reagent, $\geq 98.0\%$, Sigma-Aldrich)

Rékové výlisky – odrůdy Fratava, Modrý Portugal (Lobkowiczské zámecké vinařství Roudnice nad Labem), Svatovavřínecké (soukromý vinař z oblasti Mělnicka), červená řepa (drobný pěstitel), dubová kůra (Megafyt Pharma, s.r.o., ČR)

Květy rostlin: zlatice prostřední (*Forsythia intermedia*), janovec metlatý (*Cytisus scoparius*), zákula japonská (*Kerria japonica*), řepka olejka (*Brassica napus*), azalka žlutá (*Rhododendron luteum*), pampeliška lékařská (*Taraxacum officinale*), kamzičník východní (*Doronicum orientale*).

8.2 Textilní materiály použité k experimentům

Bavlněná doprovodná tkanina pro zkoušení stálobarevnosti textilií dle ČSN 800101, (110 g/m²)

Vlněná tkanina pro zkoušení stálobarevnosti textilií dle ČSN 800107, (153 g/m²)

Doprovodná tkanina z polyamidové stříže dle ČSN 800113 (78 g/m²)

8.3 Metody

8.3.1 Extrakce barviv a barvení textilií

Pro dvoustupňový (extrakci barviv a následné barvení) i jednostupňový proces (extrakce barviv probíhající současně s barvením) byl používán barvicí aparát Ahiba Nuance ECO (Datacolor) s mikrovlnným ohřevem a regulací otáček patron a programovatelným barvicím cyklem. Tento přístroj byl zároveň používán pro testy odolnosti v praní.

8.3.2 Analýza extraktů a obarvených tkanin

a) Instrumentální analýza

Absorpční spektrofotometrie – jednokanálový spektrofotometr Helios Epsilon (Thermo Scientific) a dvoukanálový spektrofotometr UV- 1600 PC (Mapada, Čína)

Rastrovací elektronová mikroskopie (SEM) - přístroj UHR SEM Ultra Plus (Carl Zeiss)

EDS – součást SEM (Scanning Electron Microscopy with Energy Dispersive X-ray Spectroscopy). EDS poskytuje kvalitativní a kvantitativní prvkovou analýzu vzorku do hloubky 1 - 2 mikrometry.

Cyklická voltametrie

Pro metodu cyklické voltametrie byly použity přístroje Potenciostat / Galvanostat Autolab 12/30/302 (Metrohm) se softwarem GPES (General Purpose Electrochemical System for Windows – version 4.9.007) a elektrochemická pracovní stanice CHI660C (Chenhua, Čína), v zapojení skelný uhlík (pracovní elektroda) - argentochloridová elektroda (referenční elektroda) - platinová elektroda (pomocná elektroda). Skenovací rychlosti: 20, 50, 100 a 200 mV/s, rozsah potenciálů: 0 – 1.2 – 0 V

ICP spektrometrie (Inductively Coupled Plasma)

ICP spektrometr je optický emisní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem ke stanovení stopových koncentrací prvků ve vzorku. Zmlžený vzorek je odpařen v hořáku argonovým plazmatem, atomy excitovány a návrat elektronů na původní hladiny doprovází emise záření o určité vlnové délce, která je detekována. Intenzita signálu odpovídá množství prvku ve vzorku.

Měření byla prováděna na zařízení ICP-OES Perkin Elmer Optima 2100, případně na zařízení s nižším detekčním limitem kovů ICP-MS Perkin Elmer NexIon 300D.

Remisní spektrofotometrie (měření reflektance) – měření CIE Lab hodnot barevných tkanin (Datacolor)

U tkanin byly pomocí remisního spektrometru měřeny $L^*a^*b^*$ hodnoty (jedná se o modifikované hodnoty barevného prostoru CIE XYZ), označující světelnost (jas) L^* (černá 0, bílá 100), barevný posun na ose a^* (+ červená, - zelená) a posun na ose b^* (+žlutá, - modrá) a z hodnot byly vypočteny barevné odchylky podle vzorce (13):²⁴⁸

$$\Delta E = \sqrt{(L_2^* - L_1^*)^2 + (a_2^* - a_1^*)^2 + (b_2^* - b_1^*)^2} \quad (13)$$

Porovnání objektivně změřených hodnot $L^*a^*b^*$ a barevné odchylky ΔE se subjektivním hodnocením tzv. šedé stupnice pro hodnocení změny odstínu je v tab.5.

Stupeň 5 šedé stupnice představuje minimální odstínovou odchylku, což znamená maximální stabilitu vzorku vystaveného zátěži, stupeň 1 představuje velkou odstínovou změnu vzorku oproti předloze, tedy nejhorší stupeň stálosti.

Tab.5: Porovnání subjektivního a objektivního hodnocení barevné odchylky ΔE

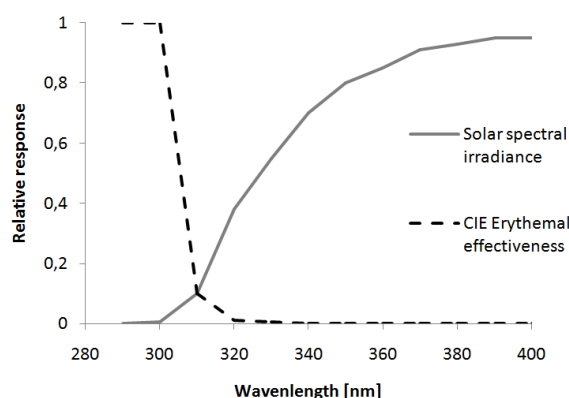
STUPEŇ ŠEDÉ STUPNICE (GSR)	ODSTÍNOVÁ ODCHYLKA CIE Lab (ΔE)
5	0 – 0.40
4 - 5	0.41 – 1.25
4	1.26 – 2.10
3 - 4	2.11 – 2.95
3	2.96 – 4.10
2 - 3	4.11 – 5.80
2	5.81 – 8.20
1 - 2	8.21 – 11.60
1	> 11.61

Měření UPF (Ultraviolet Protection Factor)

Ochrana tkanin proti UV záření byla měřena pomocí UV spektrofotometru Shimadzu UV-3101 PC. Tento test spočívá v měření difuzní spektrální transmittance v ultrafialovém spektru textilního materiálu. Transmittance je hodnota UVA a UVB záření, které projde přes testovaný vzorek a nabývá hodnot 0-1. Transmittanci vyjadřuje rovnice (14), kde I_0 je intenzita dopadajícího záření a I je intenzita záření, které textilií projde:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (14)$$

Transmittance vyjádřená v % (0-100) se nazývá transmise. UPF se vypočte podle vzorce (15), kde E_λ je CIE erytemální spektrální efektivita, S_λ je solární spektrální ozáření, T_λ je spektrální transmittance a $\Delta\lambda$ je rozdíl vlnových délek.²⁴⁹



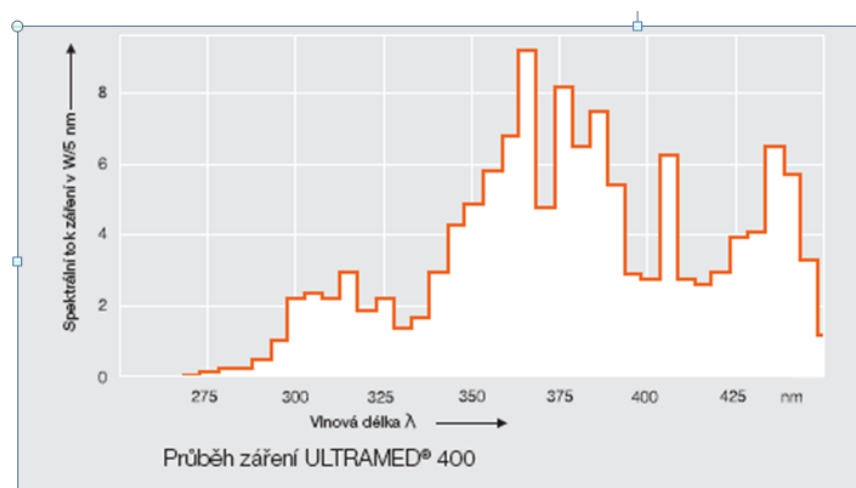
Obr.41 Průběh standardizovaných funkcí E_λ a S_λ

$$UPF = \frac{\sum_{290nm}^{400nm} E_\lambda \times S_\lambda \times \Delta\lambda}{\sum_{290nm}^{400nm} E_\lambda \times S_\lambda \times \Delta\lambda \times T_\lambda} \quad (15)$$

E_λ je standardizovaná funkce popisující relativní citlivost kůže (vznik erytému – zarudnutí) na jednotlivé vlnové délky. Navrhli ji McKinlay a Diffey²⁵⁰ v r. 1987 a byla přijata jako standard Mezinárodního komisí pro osvětlení (CIE). S_λ vyjadřuje spektrální rozložení slunečního záření dopadajícího na zemský povrch (obr.41).²⁵¹

Test světlostálosti textilií

Tento test odolnosti vybarvení vůči působení světla blíže specifikuje norma ČSN 80 0147, případně AATCC 16-1998.²⁵² Testovat obarvené tkaniny lze na slunečním světle při sčítání hodin slunečního svitu. Zrychlený test odolnosti vůči světlu se provádí pomocí xenonové výbojky (tzv. xenotest), která celý proces značně urychluje. Tkaniny v této práci byly testovány pomocí výbojky Ultramed 400 s výkonem 18.8 W/m^2 v oblasti UVA a 1.71 W/m^2 v oblasti UVB (obr.42).



Obr.42 Průběh záření výbojky Ultramed 400²⁵³

Vzorky byly umístěny ve vzdálenosti cca 0.7 m od zdroje, kolmo na zdroj záření. Tkaniny byly částečně zakryté tak, aby vznikly 4 zóny testovaných oblastí po 0, 2, 4 a 8 hodinách osvětlení. Spolu se vzorky byly UV záření vystaveny i vlněné textilie z tzv. modré stupnice světlostálosti, což jsou textilie barvené různými typy modrých barviv v 8 stálостních stupních, kdy stupeň 1 je narušen na přirozeném slunečním světle už po několika hodinách, stupeň 8 až po několika letech. Testy ukázaly, že umělé UV záření narušilo stupeň 1 už po 1 hodině osvětlení, stupeň 2 byl značně narušen po 4 hodinách osvětlení a po 8 hodinách došlo k narušení stupně 4 modré stupnice světlostálosti.

Testy odolnosti v praní

Stálost v praní byla prováděna upraveným postupem na základě normy ČSN EN ISO 105-a01 (80 0120) - Textilie - Zkoušky stálobarevnosti - Část A01: Všeobecné principy zkoušení. Podle této normy se testuje tzv. sdružený vzorek - prošívaný vzorek $10 \times 4 \text{ cm}$ složený ze tří tkanin: první doprovodná neobarvená tkanina (ze stejných vláken jako zkoušená barevná tkanina), uprostřed je testovaná barevná tkanina a dále druhá doprovodná neobarvená tkanina definovaná normou (vlna pro testovanou bavlnu a naopak).

Sdružený vzorek byl vložen do rotačních patron barvicího aparátu a vyprán v termostátované vodní lázni 30 °C s přidavkem tekutého pracího prostředku bez optického zjasňovače, bez enzymů a bez úpravy (alkalizace) pH. Prací prostředek byl dávkován v množství 20 ml na litr prací lázně, praní probíhalo při poměru lázně 1:50 po dobu 30 nebo 60 minut v destilované vodě, v režimu pro praní jemného prádla (1 ot./min.).

Po oddělení sušení byly subjektivně hodnoceny změny barvy barvené textilie a zároveň zapouštění na doprovodné tkaniny podle pětistupňové šedé stupnice ve standardizovaném osvětlení D45.

Zdravotní nezávadnost obarvených tkanin

Vybrané vzorky byly testovány postupem uvedeným ve vyhlášce 84/2001 Sb.²⁵⁴, příloha č.10, bod 5 a 6 – Obsah rizikových prvků v extraktech modelujících kyselý a alkalický pot.

Pro stanovení hodnot vyluhovaných kovů byly louhovány 2 g textilie v100 ml roztoků modelujících kyselý a alkalický pot, při teplotě 37 °C po dobu 4 hodin. Následně byly textilie z roztoků vyjmuty a výluhy analyzovány na přístrojích ICP-OES Perkin Elmer Optima 2100, některé prvky (Pb, Ni, Co) byly přeměřeny na přístroji s nižším detekčním limitem (ICP-MS Perkin Elmer NexIon 300D

Simulovaný alkalický pot:

0.5 g monohydrátu L - histidinmonohydrochloridu ($C_6H_9O_2N_3.HCl.H_2O$)

5.0 g chloridu sodného (NaCl)

5.0 g dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu disodného ($Na_2HPO_4.12 H_2O$)

pH roztoku se upraví na hodnotu 8.0 roztokem hydroxidu sodného (NaOH)

o koncentraci 0.1 mol/l

Simulovaný kyselý pot:

0.5 g monohydrátu L - histidinmonohydrochloridu ($C_6H_9O_2N_3.HCl.H_2O$)

5.0 g chloridu sodného (NaCl)

2.2 g dihydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného ($NaH_2PO_4.2 H_2O$)

pH roztoku se upraví na hodnotu 5.5 roztokem hydroxidu sodného (NaOH)

o koncentraci 0,1 mol/l

Tab.6 obsahuje přehled limitů kovů vztažených na hmotnost tkaniny, vyluhovaných do alkal. a kyselého potu, které nesmí být podle vyhlášky 84/2001 Sb. překročeny:

Tab.6 Povolené max. limity kovů vyluhovatelných z textilií do simulovaného potu podle ²⁵⁴

Prvek	Limit [mg/kg]
Nikl	max. 1.0
Olovo	max. 0.2
Chrom	max. 1.0
Měď	max. 25.0
Kobalt	max. 1.0
Kadmium	max. 0.1

b) Chemická laboratorní analýza

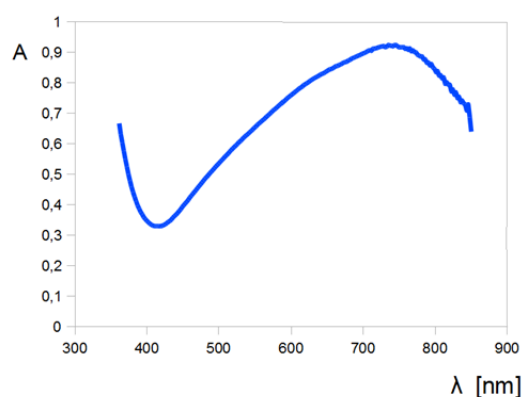
Stanovení fenolových skupin pomocí Folin-Ciocalteu činidla

Tato metoda spočívá ve spektrofotometrickém vyhodnocení nárůstu absorbance roztoku při 736 nm, kdy vznik různě intenzivního modrého zbarvení indikuje množství přítomných fenolových skupin. Kvantifikace byla prováděna pomocí kalibrační rovnice s použitím standardu (kyselina gallová).

Tato analytická metoda byla vyvinuta v 50. letech minulého století a propracována do mnohých modifikací. Je to metoda nespecifická a umožňuje stanovit monofenoly i polyfenoly. Přestože je dnes možné stanovovat polyfenoly jinými sofistikovanými metodami, je stále používána pro orientační zjištění celkových polyfenolů a citována v mnoha vědeckých pracích.^{255, 256}

Žluté Folin-Ciocalteuovo činidlo obsahuje molybdenan sodný (Na_2MoO_4), wolframan sodný (Na_2WO_4), kyselinu trihydrofosforečnou (H_3PO_4), kyselinu chlorovodíkovou (HCl) a síran lithný (Li_2SO_4). Podstatou analýzy je oxidace fenolů v zásaditém prostředí za současné redukce molybdenanu na oxid molybdeničitý. Vzniká modře zbarvený roztok, který má silnou absorbanci v oblasti kolem 736 nm (obr.43). Jako standard je nejčastěji používána kyselina gallová a výsledek se vyjadřuje jako ekvivalent její koncentrace.

Činidlo se dá laboratorně připravit, jeho příprava je však velmi náročná, (wolframan a molybdenan sodný se vaří s kyselinou fosforečnou a chlorovodíkovou pod zpětným chladičem asi 10 hodin, po zchladnutí se přidá síran lithný a bróm, vaří se dalších 15 minut a po zchladnutí se roztok zředí vodou, homogenizuje a filtruje), proto se spíše vyplatí hotové činidlo koupit.



Obr.43 Absorpční spektrum Folinova činidla indikujícího přítomnost fenolů

Metodu je třeba optimalizovat na konkrétní vzorky. Běžně jsem používala Folinovo činidlo v ředění 1 díl činidla : 9 dílů vody. Tento roztok byl dávkován do zkumavek v poměru 1:1 s 0.75 M roztokem uhličitanu sodného (bezvodého), následně se přidá určité množství vzorku (nutno optimalizovat tak, aby výsledná absorbance vzniklého modrého roztoku nepřesáhla měřitelnou hodnotu) a po 45 – 60 minutách inkubace ve tmě (nutno vždy dodržet stejný čas, teplotu, poměr reagentů a další podmínky inkubace pro kalibrační standard i vzorky) se odečítá hodnota absorbance v kyvetě absorpčního spektrofotometru při přibližně 736 nm (spektrum výsledného modrého roztoku nemá výrazné maximum, proto se hodnota, při níž se měří absorbance, u různých experimentátorů mírně liší). Všechna měření byla standardně prováděna trojnásobně, z nich byla vypočtena průměrná hodnota absorbance, která byla dosazena do kalibrační rovnice standardu a takto vypočtena koncentrace polyfenolů.

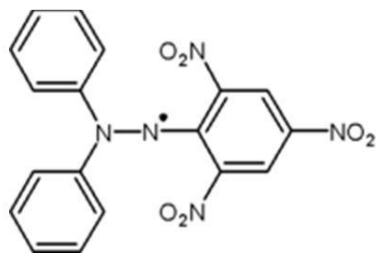
Stanovení množství taninů pomocí kožního prášku²⁵⁷

Český lékopis obsahuje postup stanovení obsahu polyfenolů a tříslovin v duběnkové tinktuře. Nejprve se stanovují celkové polyfenoly pomocí kyseliny fosfowolframové v zásaditém prostředí uhličitanu sodného, po 2 min. se měří absorbance při 715 nm za použití vody jako blanku. Následně se přidá ke stanovovanému roztoku 0.10 g kožního prášku a 60 min se intenzívně protřepává, pak se zfiltruje. Filtrát se zředí vodou stejně jako při stanovení celkových polyfenolů a ve stejných poměrech se přidá kyselina fosfowolframová a uhličitan sodný, po 2 min. se měří absorbance při 715 nm. V lékopisu je jako kalibrační standard uveden pyrogallol a výsledek, který se vypočítává z rozdílu celkových polyfenolů a polyfenolů neadsorbovatelných na kožní prášek, se uvádí jako množství pyrogallolu a je vyjádřením obsahu tříslovin (tedy taninů, které mají afinitu ke kožním bílkovinám – viz vyciňování kůží).

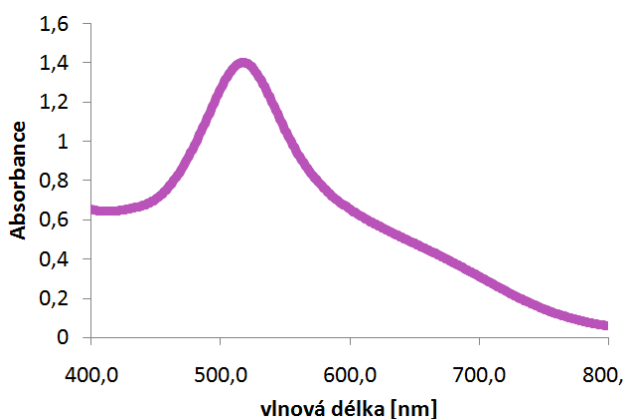
Používala jsem tuto metodu modifikovanou a přizpůsobenou již výše uvedenému vypracovanému postupu stanovení polyfenolů s pomocí Folinova činidla. Jako náhradu officinálního kožního prášku jsem použila namletou usušenou kůži z vepřového kolene (podstatný je obsah kožních bílkovin – kolagen a keratin) a jako standard kyselinu gallovou. Absorbanci jsem měřila ve zjištěném absorpčním maximu (736 nm) a reakce probíhala ve tmě po dobu 45 – 60 minut.

Stanovení antioxidační aktivity pomocí stabilního radikálu DPPH²⁵⁸

Tato metoda spočívá ve spektrofotometrickém vyhodnocení poklesu absorbance roztoku stabilního radikálu DPPH (1,1- difenyl 2- pikrylhydrazyl, obr.44) v ethanolu nebo methanolu při 515 – 525 nm (obr.45). Měří se rychlost poklesu absorbance nebo srovnání absolutního poklesu absorbance, která je spojena s deaktivací radikálu a změnou jeho barvy z purpurové na žlutou.



Obr.44 Stabilní radikál DPPH



Obr.45 Průběh absorpčního spektra DPPH

Přibližná kvantifikace anthokyanů v roztoku s využitím nárůstu a poklesu absorbance v závislosti na změně pH

Metoda podle Giustiové a Wrolstada⁵³ je spektrofotometrická metoda kvantitativního stanovení anthokyanů, při které je na základě měření absorbancí roztoku anthokyanů při pH 1 a pH 4.5 (je počítán rozdíl při 520 a 700 nm) a při znalosti molárního absorpčního koeficientu ϵ (dříve extinkční koeficient) příslušného anthokyanu vypočtena jeho koncentrace v roztoku

dosazením do vztahů (16), (17) vycházejících z rozdílné barevnosti v různě kyselém pH a z Lambert-Beerova zákona. Podle ředění je dopočten jeho obsah ve vzorku.

$$A = (A_{VIS-max} - A_{700})_{pH 1.0} - (A_{VIS-max} - A_{700})_{pH 4.5} \quad (16)$$

$$c_{ACY} = (A * M * DF * 1000) / (\epsilon * l) \quad (17)$$

A	absorbance [-] při pH 1 a 4,5 při $\lambda \pm 520$ nm a 700 nm
l	délka optické dráhy (šířka kyvety) (1 cm)
ϵ	absorpční koeficient [litr/cm/mol]
M	molární hmotnost anthokyanu (450 g/mol)
DF	celkové ředění (při extrakci* při fotometrování)
CA _{CY}	výsledná koncentrace monomerního anthokyanu [mg/litr]

c) Biologické testy

Antibakteriální aktivita

Antibakteriální aktivita obarvených tkanin byla zjišťována s použitím Gram-negativní bakterie *Escherichia coli* a Gram-pozitivní bakterie *Staphylococcus gallinarum*. Vycházela jsem z oficiální testovací metody AATCC 100-2012.²⁵⁹

Jedná se o metodu kvantitativního testování antibakteriální povrchové úpravy textilií. Na Petriho misky s univerzální pevnou živnou půdou pro kultivaci bakterií se vyočkovává zředěné bakteriální inokulum, které bylo po stanovenou dobu v dynamickém kontaktu s upravenou tkaninou. Po 24 h inkubace při 37 °C se počítá úbytek kolonií (CFU) porovnáním s inokulem, které bylo v kontaktu s neošetřenou textilií.

Modifikovaná metoda: Zředěním původního inokula v tekutém živném médiu TSB pomocí sterilního fyziologického roztoku byly připraveny bakteriální suspenze o koncentracích 10⁴ CFU v 1 ml. 0.5 g obarvené tkaniny a 0.5 g původní neobarvené tkaniny (blank byl pouze vystaven jednu hodinu varu ve vodní lázni), byly umístěny do uzavřených zkumavek s 10 ml inokula o koncentraci 10⁴ CFU v 1 ml. Vzorky byly ponechány po dobu 4 a 24 hodin v dynamickém kontaktu s inokulem za mírného třepání na oscilační třepače při pokojové teplotě. Po 4 a 24 hodinách byly tkaniny přeneseny do 30 ml sterilního fyziologického roztoku. 1 ml z těchto 30 ml fyziologického roztoku byl po 5 minutách intenzivního třepání vyočkován na pevnou univerzální kultivační půdu TSA. Kultivace probíhala v inkubátoru při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Byly spočítány počty narostlých kolonií a vyjádřen jejich pokles v % vzhledem k neobarvenému blanku.

Následný test byl proveden s tkaninami, které po barvení prošly 1, 2 nebo 3 pracími cykly, přičemž každý trval 30 minut. Barvené tkaniny a neobarvené blanky (opět každý 0.5 g) byly vystaveny dynamickému kontaktu s 10 ml bakteriálního inokula *E. coli* nebo *S. gallinarum* (koncentr. 10⁴ CFU v 1 ml) po dobu 8 hodin při teplotě 37 °C. Následně byly všechny vzorky silně třepány v 10 ml sterilního fyziologického roztoku a 1 ml každého roztoku byl vyočkován na TSA. Po 24 hodinách inkubace při 37 °C se počítají narostlé kolonie a vyjádří se v procentech jejich úbytek vzhledem k neobarvenému blanku.

9. Experimentální část

9.1 Základní analýza barvicích materiálů

9.1.1 Sušení

Dubová kůra

Pro experimenty byla používána sušená dubová kůra zakoupená v lékárně (Megafyt Pharma, ČR), která je směsí kůry z dubu letního (*Quercus robur*), dubu zimního (*Quercus petraea*) a dubu pýřitého (*Quercus pubescens*). **Sesychací poměr** (hmotnost materiálu před sušením : hmotnost suchého materiálu) tedy nebyl zjišťován, ale firma Leros, ČR (výrobce bylinných čajů a čajových směsí) uvádí na svých internetových stránkách sesychací poměr dubové kůry 3:1.

Výlisky z modré révy

Na většinu barvicích experimentů byly používány výlisky odrůdy Fratava z Lobkowiczského zámeckého vinařství Roudnice nad Labem s.r.o. Fratava je odrůda s vysokým obsahem anthokyanů. Byla vyšlechtěna v 70. letech křížením odrůd Svatovavřínecké a Frankovka, jako nová odrůda byla uznána v r. 2008 zápisem do Státní odrůdové knihy ČR.²⁶⁰

Čerstvé výlisky z modré révy byly ihned po lisování zmrazeny a následně pro experimenty vysušeny do konstantní hmotnosti při 70 °C po dobu 6 hodin. Byl zjištěn sesychací poměr 2.5 : 1 (čerstvé výlisky:suchý materiál). Výlisky obsahovaly směs slupek, jadérek a třapin, jejichž sesychací poměry jsou uvedeny v tab.7, přičemž nadpoloviční množství (60 hm.%) tvořily slupky s obsahem anthokyanů.

Tab.7 Sesychací poměry a složení révových výlísků

Složka	Podíl [hmotn.%]	Sesychací poměr
Slupky	60.0	2.6 : 1
Jadérka	36.5	1.9 : 1
Třapiny	3.5	2.3 : 1
Celkem	100.0	2.5 : 1

Červená řepa

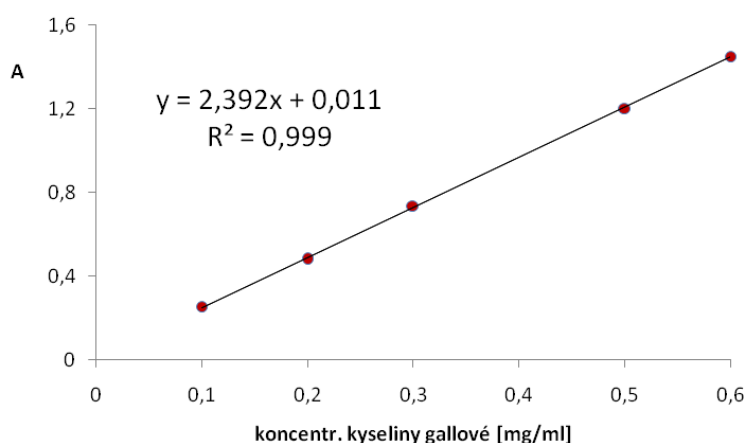
Pro barvicí experimenty byla použita zakoupená červená řepa – většina malých konzerváren, které u nás řepu zpracovávají, se nachází na Moravě (např. konzervárna Novák, Hrabětice, konzervárna EKON, Miroslav, konzervárna Tomek, Dolní Kounice aj.). Z důvodu nedostupnosti reálného čerstvého odpadu z červené řepy z konzerváren byly pokusy prováděny na čerstvé červené řepě. Byl zjištěn sesychací poměr červené řepy 4.5:1.

9.1.2 Kvantifikace obsahu polyfenolů a taninů

Analýzy extraktů byly provedeny metodami popsány v kapitole 8.3.2 *Metody - Analýza extraktů a obarvených tkanin – Chemická laboratorní analýza*. 0.5 g každého materiálu bylo extrahováno varem ve 100 ml destilované vody (tj. 5 g sušeného materiálu/litr vody) – se zřetelem k optimálním podmínkám extrakcí (viz dále kapitoly 9.2.1, 9.3.1 a 9.4.1) byla dubová kůra extrahována po dobu 1 hodiny, sušené výlisky z révy, sušené květy pampelišek po dobu 30 minut a sušená červená řepa po dobu 15 minut. S použitím Folinova činidla bylo prováděno stanovení obsahu celkových polyfenolů v jednotlivých extraktech, kvantifikace byla prováděna s pomocí standardu (kyselina gallová) a kalibrační rovnice (obr.46).

U extraktů z dubové kůry, révových výlisků a květů pampelišky byla provedena následná analýza obsahu taninů modifikovanou metodou stanovení taninů pomocí kožního prášku, na jehož povrch se navázaly taniny ve směsi a zbytek byl po filtraci opět analyzován pomocí Folinova činidla. Rozdíl (TPF – nPF) odpovídá obsahu polyfenolů neadsorbovaných na kožní prášek, úbytek polyfenolů tedy odpovídá množství taninů (tríslovin). Ve výliscích byl dále zjišťován obsah anthokyanů metodou podle Giustiové a Wrolstada.

Kvantifikaci barviv v červené řepě není možné touto metodou provést – zkouška s Folinovým činidlem dává s extraktem sice slabě pozitivní reakci, ta ale odpovídá jen obsahu doprovodných fenolových sloučenin v řepě, např. fenolových kyselin a změny pH (pH 1 a 4.5) nevedou k barevným rozdílům jako u stanovení anthokyanů.



Obr.46 Kalibrační přímka a kalibrační rovnice pro výpočet obsahu polyfenolů (standard: kyselina gallová)

Lineární regresní model pro závislost absorbance A (736) nm na koncentraci kyseliny gallové c ve tvaru $y = b_1x + b_2$ má následující odhady parametrů: $b_1 = 2.393$, $b_2 = 0.011$. Koeficient determinace je $R^2 = 0.9998$. V programu Matlab byla provedena analýza tohoto regresního modelu, výstupem jsou výsledky t-testu o významnosti jednotlivých parametrů b_i . Testační statistiky významnosti obou parametrů jsou $T_1=123.53$ pro parametr b_1 a $T_2=1.51$ pro parametr b_2 , přičemž $t_{0.025} = 3.182$. Z toho vyplývá, že parametr b_2 není významně odlišný od nuly, tzn. na hladině významnosti $\alpha = 0.05$ se nulová hypotéza ($H_0: b_i = 0$) pro parametr b_2 nezamítá. Bylo potvrzeno, že parametr b_1 je odlišný od nuly (nulová hypotéza se zamítá a přijímá se alternativní hypotéza H_A). Vzhledem k této analýze je možné pro výpočet jednotlivých koncentrací ekvivalentů kyseliny tríslové vypustit z regresní rovnice (obr.46) absolutní člen a původní regresní model zjednodušit na tvar $y = b_1x$. Získáme tak odhad parametru $b_1 = 2.418$ a nový regresní model je tedy $y=2.418x$ s koeficientem determinace $R^2 = 0.9997$.

Každé měření bylo provedeno 3x a z těchto hodnot byl vypočten průměr (\bar{x}), směrodatná odchylka (s) a variační koeficient (v_k) (tab.8). Průměrné hodnoty absorpance byly přepočteny na obsah celkových polyfenolů (TPF) a na kožní prášek neadsorbovatelných polyfenolů (nPF) vyjádřených jako ekvivalent kyseliny gallové podle upravené kalibrační rovnice $A=2.418c$. Přehled výsledků je v tab.9.

Výsledky:

Tab.8 Naměřené hodnoty absorpance (736 nm) po reakci s Folinovým činidlem a jejich statistické vyhodnocení

Materiál	TPF						nPF					
	A (736nm)			\bar{x}	s	c_v	A (736nm)			\bar{x}	s	c_v
červená řepa	0.154	0.160	0.150	0.154	0.005	0.0325	-	-	-	-	-	-
pampeliška-květ	0.212	0.215	0.201	0.209	0.007	0.0352	0.180	0.191	0.178	0.183	0.007	0.0382
révové výlisky	0.387	0.382	0.389	0.386	0.004	0.0093	0.235	0.242	0.239	0.239	0.004	0.0147
dubová kůra	0.677	0.660	0.668	0.668	0.009	0.0127	0.300	0.322	0.317	0.313	0.012	0.0368

Tab.9 Chemická analýza extraktů použitých k experimentům

Materiál	TPF [hm.%]	nPF [hm.%]	taniny [hm.%]	taniny [% z TPF]
červená řepa	1.25	-	-	-
pampeliška - květ	1.73	1.51	0.22	12.7
révové výlisky	3.19	1.98	1.21	37.9
dubová kůra	5.53	2.59	2.94	53.2

Diskuze:

Jak ukazuje tab.9, celkové množství polyfenolů vyextrahovaných ze suchých materiálů varem ve vodě se pohybovalo od 1.25 (u červené řepy) až po 5.53 % (u dubové kůry) z hmotnosti suchých materiálů, vyjádřeno pomocí ekvivalentního obsahu kyseliny gallové. Z tohoto množství připadalo na taniny od 12.7 (pampeliška – květ) do 53.2 procent (dubová kůra). Jak vyplývá z tab.8, variabilita měření se pohybovala od 0.93 do 3.82 %.

Ve výliscích odrůdy *Fratava* byl zjištěn obsah celkových polyfenolů kolem 3.2 %, přičemž asi 38 % z tohoto množství tvořily taniny. Při analýze separovaného materiálu (slupky vs. jádérka) byl zjištěn obsah celkových polyfenolů v množství přibližně **2.2 % TPF ve slupkách** a **5.3 % TPF v jádérkách** (jádérka jsou bohatým zdrojem kondenzovaných taninů, ve slupkách tvoří hlavní podíl z celkových polyfenolů obsah barevných anthokyanů).

Následná analýza množství anthokyanů v extraktech metodou podle Giustiové a Wrolstada ukazovala na obsah anthokyanů v množství až 1.3 g anthokyanu na litr u výlisků z odrůdy *Fratava* při extrakci 25 g výlisků v 1 litru vody (opět vztaheno na hmotnost suchého materiálu). To však odpovídá 5.2 hm.%, což je množství vyšší, než bylo celkové množství polyfenolů. Proto se domnívám, že tato metoda pro stanovení anthokyanů není příliš vhodná pro absolutní kvantifikaci obsahu anthokyanů. S jistotou lze jen říct, že obsah anthokyanů ve

výliscích odrůdy Modrý Portugal, která je odrůdou s mnohem nižším obsahem anthokyanů než je Fratava, byl při použití stejné metody obsah anthokyanů ve výliscích zhruba třetinový. Bez použití barevného standardu je tedy absolutní kvantifikace obsahu anthokyanů obtížná.

Lze jen odhadovat, že pokud je u některých odrůd udáván obsah polyfenolů obsažených ve víně až 6 g/litr a z tohoto množství $\frac{1}{4}$ připadá na anthokyan, macerované výlisky odrůdy Fratava s vysokým obsahem barviv používané na experimenty mohly také obsahovat zbytkové anthokyan v množství, které tvoří $\frac{1}{4}$ z celkových polyfenolů, což by odpovídalo zhruba 0.8% z hmotnosti suchých výlisků, tedy např. při nejúčinnějších extrakčních podmínkách (viz dále v kapitole 9.3.1 *Extrakce anthokyanů*) se extrakcí 80 g suchých výlisků (odpovídá zhruba 200 g čerstvých výlisků) v 1 litru vody získá barvicí lázeň o koncentraci kolem 0.6 g anthokyanů/litr (u Modrého Portugalu byla tato hodnota třetinová). Je to jen velmi hrubý odhad, ale srovnáním s výsledky z jiné studie³⁵ se zdá, že se tento odhad pohybuje v podobných mezích (autoři udávají obsah přibližně 0.5 – 2.5 g anthokyanů v suchých výliscích).

9.2 Experimenty s dubovou kůrou

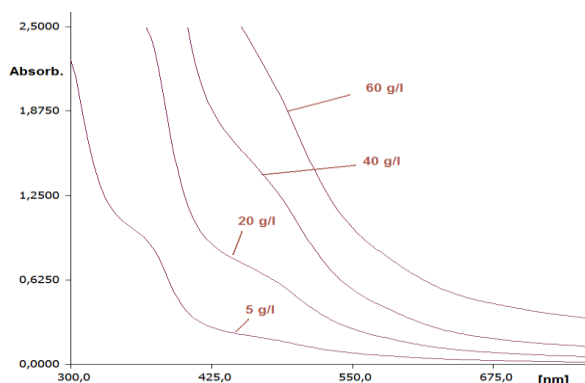
9.2.1 Extrakce katechinů a taninů^a

Postup:

Taniny a další barvicí látky z dubové kůry byly extrahovány v nerezových 200 ml patronách aparátu Ahiba, přičemž byl zkoumán vliv teploty, doby extrakce a extrakčního poměru hmotnost suché dubové kůry : objemu lázně na výtěžnost extrakce s cílem zjistit optimální podmínky pro maximální výtěžnost vodné extrakce.

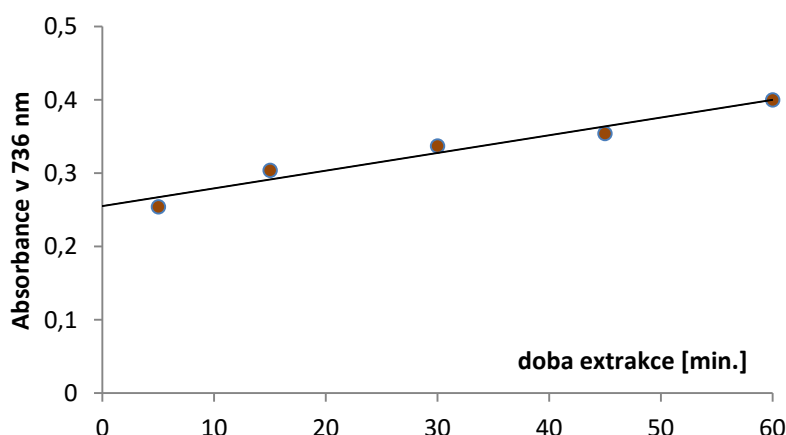
Optimální doba extrakce byla zjišťována při 90 °C, vzorky byly odebrány v časech 5 – 15 – 30 – 45 a 60 minut. Optimální teplota extrakce byla zjišťována v rozsahu teplot 60 – 140 °C. Optimální poměr rostlinný materiál : voda byl zjišťován v přepočtených koncentracích 5 – 20 – 40 - 60 a 80 g suché kůry/litr destilované vody a při teplotě 90 °C po dobu 50 minut. Všechny extrakce probíhaly při rychlosti patron 30 otáček/min.

Protože absorpční spektrum extraktu z dubové kůry nevykazuje ostré maximum (obr.47), byla vydatnost získaných extraktů měřena metodou na stanovení fenolických skupin s Folinovým činidlem.

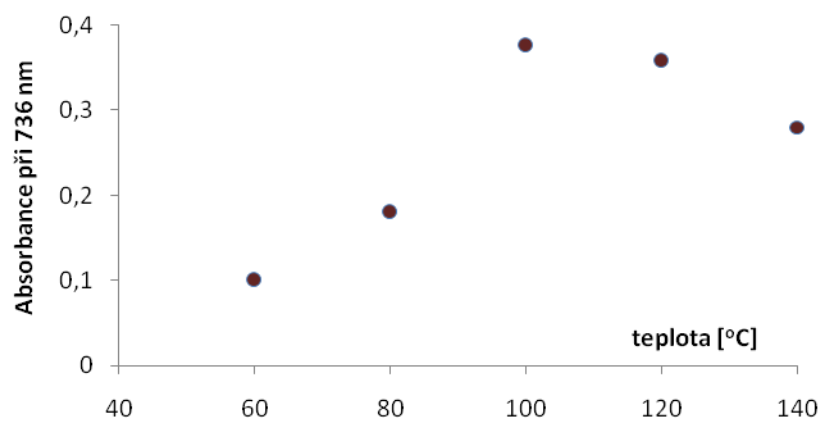


Obr.47 Absorpční spektra extraktů z dubové kůry

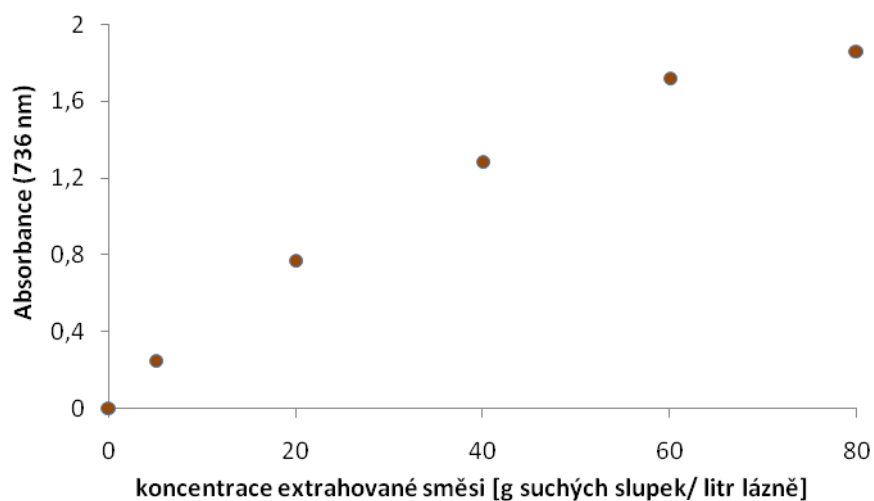
Výsledky:



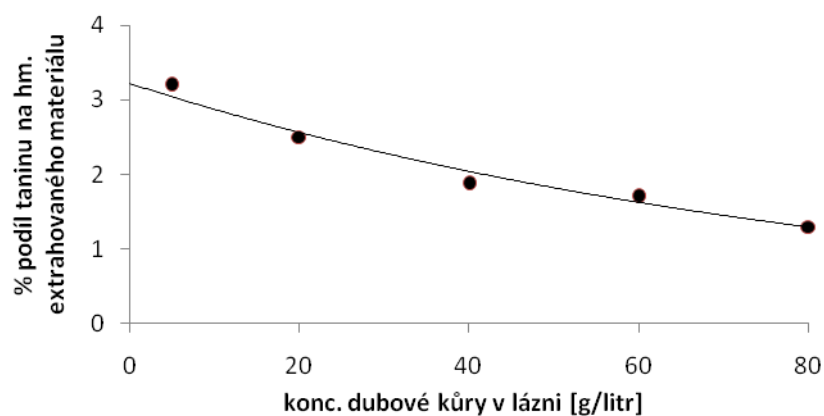
Obr.48 Nárůst absorpance extraktu z dubové kůry v 736 nm po reakci s Folinovým činidlem v závislosti na době extrakce při 90 °C



Obr.49 Množství vyextrahované kyseliny tříslové v závislosti na teplotě (60 minut) vyjádřené absorbancí po reakci s Folinovým činidlem



Obr.50 Nárůst koncentrace polyfenolů ve vodné lázni při extrakci dubové kůry a při zvyšování množství extrahovaného materiálu v jedné lázni (90 °C)



Obr.51 Množství získané kyseliny tříslové vyjádřené v % hmotnosti extrahovaného materiálu při zvyšování koncentrace dubové kůry v extrakční lázni (90 °C, 1 hodina extrakce)

Z grafu na obr.48 vyplývá, že při 90 °C lze provádět extrakci taninů déle než hodinu, protože hodnoty vyextrahovaných polyfenolů stále rostly. I drcená dubová kůra je tvrdý a těžko extrahovatelný materiál, proto je potřeba volit i delší extrakční čas.

Podle literatury je např. samotná kyselina tříslová značně odolná vůči tepelné degradaci: dle studie jejího termálního rozkladu²⁶¹ dochází mezi 30 a 150 °C k její dehydrogenaci a teprve v rozmezí teplot 230 - 380 °C v přítomnosti kyslíku (resp. v rozmezí 230 – 400 °C v dusíkové atmosféře) dochází k uvolňování 1, 2, 3- benzotriolu a CO₂, při teplotě nad 400 °C (až do 750 °C) se uvolňuje CO₂ a 1, 2- benzendiol. Jiná studie zkoumala termální hydrolýzu kyseliny tříslové rozpuštěné ve vodě²⁶² a zvýšené množství uvolněné kyseliny gallové bylo detekováno až při 150 °C, při 200 °C se ve směsi objevilo větší množství pyrogallolu.

Nicméně dubová kůra neobsahuje pouze čistou kyselinu tříslovou, nýbrž je směsí různých polyfenolů a jak ukazuje průběh grafu na obr.49, v experimentech teplota nad 100 °C po dobu 1 hodiny již vedla k úbytku celkových polyfenolů v tomto vodném extraktu. Graf na obr.49 ukazuje, že nejvýhodnější teplota extrakce dubové kůry je asi 100 °C při 1 hodině extrakční doby.

Jak je patrné z grafu na obr.50, při rostoucím poměru hmotnosti dubové kůry k objemu lázně rostla výtěžnost přibližně do koncentrace 60 g suché kůry na litr extrakční lázně, dále se již obsah polyfenolů s nárůstem množství dubové kůry v omezeném objemu vody výrazně nezvyšoval. Graf na obr.51 ukazuje klesající efektivitu tohoto zvyšování množství extrahovaného materiálu ve stejném objemu lázně (vyjádřeno v % hmotnosti z extrahovaného materiálu).

9.2.2 Barvení dubovou kůrou a stálostí^{a, b}

Vlněná, bavlněná a polyamidová tkanina byly barveny extraktem z dubové kůry o koncentraci 20 – 40 – 80 g sušené dubové kůry/ 1 litr lázně po dobu 1 hodiny při teplotě 95 °C lázněným (vytahovacím) způsobem v barvicích patronách, s ohřevem lázně 4 °C/min, rotací patron 20 ot./min., poměru lázně 1:50, bez moření. Po barvení následovalo praní a test světlostálosti (viz kapitola 8.3.2 *Metody – Analýza extraktů a obarvených tkanin – Instrumentální analýza*).

Výsledky:



Obr.52 Tkaniny barvené extraktem z dubové kůry,

100%, 50% a 25 % odpovídá obsahu 80, 40 a 20 g suché drcené kůry /litr barvicí lázně.

Tab.10 $L^*a^*b^*$ hodnoty tkanin z obr.52 (pozn. PA = polyamid, CO = bavlna, WO = vlna)

Tkanina	Barvivo	L^*	a^*	b^*
PA	100%	62.4	11.8	16.1
PA	50%	65.5	10.9	13.2
PA	25%	72.4	8.2	10.4
CO	100%	85.9	7.1	14.2
CO	50%	87.5	5.7	11.8
CO	25%	89.1	5.2	9.4
WO	100%	58.4	13.2	22.2
WO	50%	63.5	11.2	19.4
WO	25%	74.5	10.4	20.8

Tab.11 Stálosti tkanin obarvených dubovou kůrou v koncentraci 80 g dubové kůry/ litr

Materiál	Stálost v praní (stupeň šedé stupnice)	Stálost na světle (stupeň modré stupnice)
PA	4 - 5	> 4
CO	3	> 4
WO	3	> 4

Kinetika barvení

Nemořená vlněná, bavlněná a polyamidová tkanina byly barveny v oddělených lázních barvicího aparátu extraktem z dubové kůry při 70 °C. V intervalech 0, 15, 30, 60 a 90 minut byly odebrány vzorky barvicích lázní a byl v nich zjišťován úbytek barviva. Na základě těchto údajů byly vypočteny difúzní koeficienty, vytažení barviva z lázně, teoretická rovnovážná hodnota barviva na vláknech, poločasy barvení a rychlostní konstanty těchto barvicích soustav.

Množství barviva bylo kvantifikováno jako celkový obsah polyfenolů pomocí Folinova činidla s použitím kalibrační rovnice standardu (kyseliny gallové) měřeného spektrofotometricky při 736 nm. Na přípravu barvicí lázně bylo extrahováno 15 g sušené dubové kůry v 1 litru vody varem po dobu 30 minut. Teplota barvení byla zvolena poměrně nízká (70 °C), aby během barvení nedocházelo v barvicí lázni k příliš velkým změnám v obsahu polyfenolů a výsledek tak nebyl ovlivněn rozkladem barviva. Případné změny v množství barviva byly zjišťovány ve slepé lázni bez textilie, kde byl měřen obsah polyfenolů na počátku a na konci barvicího cyklu. Každé měření bylo provedeno 3x a vypočítány průměrné hodnoty, podobně jako v kap. 9.1.2 *Kvantifikace obsahu polyfenolů a taninů*.

Podle kalibrační rovnice koncentrační přímky kyseliny gallové (ohr.46) byl stanovován obsah barviva (respektive polyfenolů) v lázni. Do zkumavek bylo dávkováno: 1 ml 10x zředěného Folinova činidla, 50 mikrolitrů vzorku, 1 ml 0.75 M uhličitanu sodného, inkubováno 30 minut ve tmě.

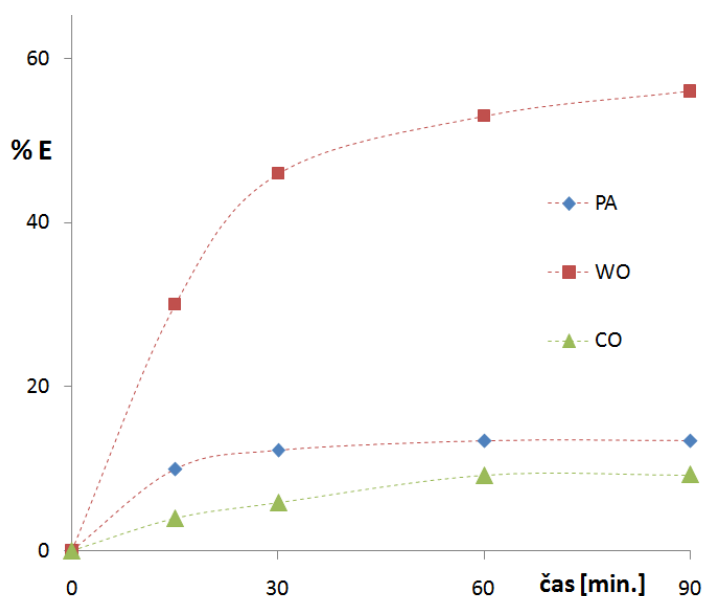
Výsledky:

Koncentrace barvicí lázně: absorpance 1.445 (při 736 nm) odpovídá obsahu přibližně 0.6 g kyseliny gallové v 1 litru. Do čtyř barvicích patron bylo dávkováno po 50 ml této lázně a do tří z nich byly přidány tkaniny o hmotnosti 1 g každá, (čtvrtá patrona bez tkaniny).

V tab.12 je přehled absorbancí po reakci s Folinovým činidlem a přepočtených koncentrací jednotlivých barvicích lázní během barvení (vyjádřeno v g/litr ekvivalentu kyseliny gallové), a dále procenta vytažení barviva z lázně (%E). Pravděpodobné průběhy vytahovacích křivek všech tkanin jsou znázorněny na obr.53.

Tab.12 Koncentrace a vytažení z lázně polyamidové, vlněné a bavlněné tkaniny při barvení extraktem z dubové kůry (při 70 °C)

Materiál		0 min.	15 min.	30 min.	60 min.	90 min.
PA	A (736 nm)	1.445	1.300	1.267	1.250	1.249
	koncentr. [g/litr]	0.602	0.54	0.528	0.521	0.525
	%E	0	10.13	12.29	13.45	13.56
WO	A (736 nm)	1.445	1.011	0.737	0.680	0.585
	koncentr. [g/litr]	0.602	0.421	0.307	0.283	0.244
	%E	0	30.03	49.0	52.9	59.5
CO	A (736 nm)	1.445	1.385	1.374	1.313	1.310
	koncentr. [g/litr]	0.602	0.577	0.572	0.547	0.546
	%E	0	4.12	5.3	9.2	9.34



Obr.53 Vytahovací křivky polyamidu, vlny a bavlny při barvení dubovou kůrou (70 °C)

Na základě vytahovacích křivek byla stanovena rovnovážná hodnota barvení pro každý druh vláken (teoretická maximální relativní koncentrace barviva na vláknech dosažená v nekonečnu, C_{∞}), a to aplikací Vickerstaffova kinetického modelu barvení (18).

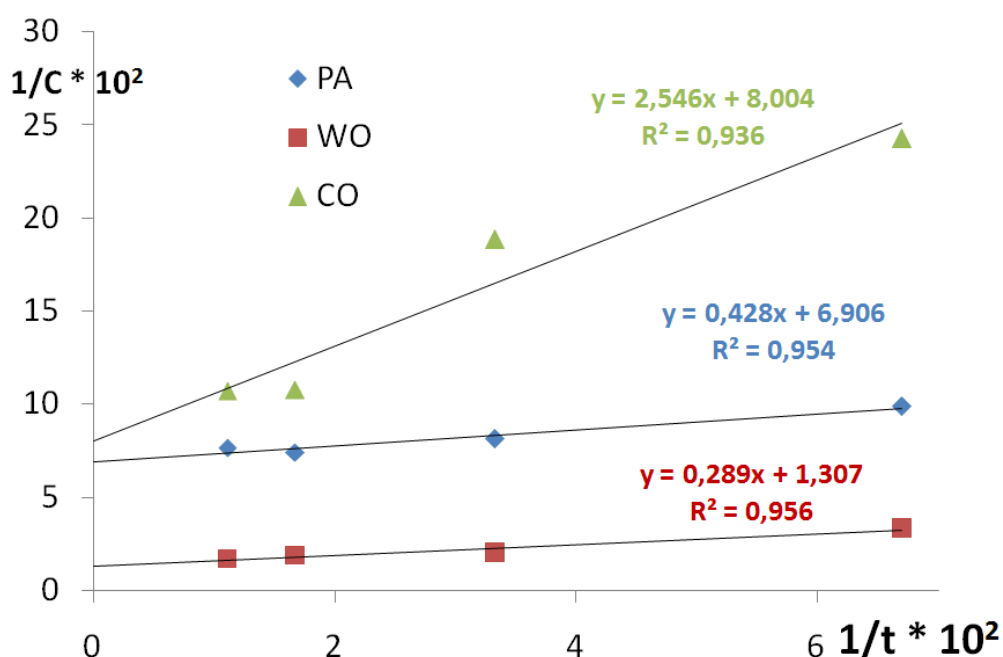
Vickerstaffova funkce (18) je jeden z modelů popisujících průběh barvení např. u přímých barviv interagujících s bavlněnými vlákny. Funkci lze po dalších úpravách linearizovat do tvaru $y = ax + b$ (19). Po vynesení převrácených hodnot času na osu x a převrácených hodnot koncentrace barviva v jednotlivých uzlových bodech na osu y a po proložení regresní přímky experimentálně zjištěnými body na ose y odečteme reciproknou hodnotu rovnovážné koncentrace C_{∞} pro každou barvicí soustavu (obr.54).

Z rovnovážné hodnoty barviva na vlákne C_∞ byl stanoven poločas barvení $t_{1/2}$ (tj. doba, za kterou je dosaženo poloviční rovnovážné koncentrace barviva na vlákne). Na základě snímků z elektronového mikroskopu byl stanoven přibližný průměr barvených vláken r (u bavlny se jedná o délku malé poloosy přibližně eliptického průřezu) a dosazením do vzorce²⁶³ (20) vypočteny difúzní koeficienty D těchto barvicích soustav.

$$\frac{dC_t}{dt} = K(C_\infty - C_t)^2 \quad (18)$$

$$\frac{1}{C_t} = \frac{1}{K \cdot t \cdot C_\infty} + \frac{1}{C_\infty} \quad (19)$$

$$D = \frac{0.0632}{t_{1/2}} r^2 \quad (20)$$



Obr.54 Linearizace Vickerstaffovy kinetické rovnice

Reciproké hodnoty relativní rovnovážné koncentrace barviva na vlákne (odečteno z osy y) podle tohoto modelu vycházejí u polyamidové tkaniny 14.5 %, u vlněné tkaniny 76.5 % a pro bavlnu 12.5 % původní koncentrace barviva z lázně při barvení extraktem z dubové kůry při 70 °C, což odpovídá polyfenolům (resp. ekvivalentu kyseliny gallové) na jednotlivých vláknech v koncentracích 0.087 (PA), 0.46 (WO) a 0.075 (CO) g/litr, tedy z původního množství 30 mg kyseliny gallové v 50 ml lázně se dostane v rovnovážném stavu na vlákna 4.35 mg (PA), 22.95 mg (WO) a 3.75 mg (CO) polyfenolů (resp. kyseliny gallové) / 1 g tkaniny.

Poločasy barvení $t_{1/2}$ dopočítáme dle jednotlivých regresních rovnic z obr.54 tak, že za y dosadíme poloviční hodnotu C_∞ a vypočítáme x (x zastupuje výraz $1/t * 10^2$).

Z rovnice (20) dostaneme difúzní koeficienty D a z rovnice (19) ještě rychlostní konstanty K vypočtené v poločase barvení. Přehled všech těchto hodnot je v tab.13.

Tab.13 Přehled kinetických charakteristik barvení polyamidové, vlněné a bavlněné tkaniny extraktem z dubové kůry při 70 °C

Materiál	% E_∞	C_∞ [mg/g]	$t_{1/2}$ [min.]	r [μm]	D [cm^2/s]	K [min^{-1}]
PA	14.5	0.087	6.3	10	$1.7 \cdot 10^{-7}$	0.053
WO	76.5	0.46	22.1	12	$5.7 \cdot 10^{-8}$	0.015
CO	12.5	0.075	32.5	6	$1.9 \cdot 10^{-8}$	0.010

9.2.3 Antibakteriální vlastnosti^a

Antibakteriální vlastnosti byly testovány pouze na polyamidové tkanině obarvené dubovou kůrou v koncentraci 60 g sušené kůry/1 litr barvicí lázně, tedy na materiálu, na jehož povrch se taniny nejochotněji a nejrychleji vážaly a který vykazoval nejlepší stálosti. Tkanina byla testována modifikovanou metodou AATCC 100-2012.

Výsledky:

Tab.14 Pokles počtu CFU po 4 a 24 h kontaktu s obarvenou PA tkaninou srovnáním s neobarveným blankem

Bakterie	0 h	4 h	24 h
<i>E. coli</i>	100%	71%	60%
<i>S. gallinarum</i>	100%	88%	60%

Tab.15 Pokles antibakteriální účinnosti obarvených PA tkanin po 8 h kontaktu s bakteriálním inokulem u vypraných tkanin ve srovnání s tkaninou neobarvenou, vyjádřeno vzestupem počtu narostlých CFU vůči blanku

Bakterie	bez praní	1 prací cyklus	2 prací cykly	3 prací cykly
<i>E. coli</i>	15%	18%	30%	56%
<i>S. gallinarum</i>	4%	8%	20%	36%

9.2.4 Zdravotní nezávadnost^{a, b}

Obarvené a neobarvené vzorky polyamidové tkaniny byly také testovány z hlediska zdravotní nezávadnosti. Především mne zajímal obsah kovů ve výluhu z těchto tkanin: jejich hodnoty a povolené limity pro hračky a textilie pro děti do 3 let stanovuje vyhláška 84/2001 Sb., příloha č.10, bod 5 a 6 – Obsah rizikových prvků v extraktech modelujících kyselý a alkalický pot.

Tab.16 Obsah těžkých kovů v extraktu z dubové kůry a ve výluzích tkanin obarvených dubovou kůrou

	Ni [mg/kg]	Pb [mg/kg]	Cr [mg/kg]	Cu [mg/kg]	Co [mg/kg]	Al [mg/kg]	Cd [mg/kg]
	<0.01	<0.00001	<0.002	0.03	<0.01	<0.01	<0.002
Extrakt z dub. kůry *	0.445	0.036	0.19	<1.0	0.028	2.6	0.006
Alkalický pot	0.002	0.0001	0.017	0.01	0.0005	0.024	0.00004
PA v alkal. potu	0.116	0.038	0.88	0.71	0.025	0.57	0.004
PA/dub kůra v alkal.potu	0.112	0.009	0.88	0.58	0.028	0.88	0.002
Kyselý pot	0.004	0.0007	0.018	0.12	0.0002	0.016	0.00006
PA v kyselém potu	0.206	0.067	0.93	5.57	0.011	1.05	0.005
PA/dub.kůra v kys. potu	0.245	0.003	0.84	5.79	0.013	0.69	0.004

Pozn. * vztaženo na 1 kg suché dubové kůry

Diskuze:

a) Barvení

Experimentálně byly zjištěny tyto nejefektivnější podmínky jednolázněvého způsobu vodné extrakce taninů a barvicích komponent z dubové kůry: teplota 100 °C (var) po dobu 1 hodiny při poměru přibližně 60 g suché kůry na litr extrakční lázně. Takto bylo vyextrahováno přibližně 3 g polyfenolů (ekvivalentu kyseliny tříslové) /litr lázně, což odpovídá přibližně 50 g polyfenolů (ekvivalentu kyseliny tříslové) v 1 kg suché dubové kůry.

b) Kinetika barvení

Barvení tkanin extraktem z dubové kůry probíhalo při 70 °C, při poměru 1:50 (1 g tkaniny : 50 ml lázně) po dobu 90 minut. Na tyto soustavy byl aplikován Vickerstaffův kinetický model barvení. Vycházela jsem z velmi zjednodušeného předpokladu, že úbytek barviva v lázni je roven množství barviva vytaženého na tkaninu. Tkaniny byly při odběrech vzorků lázni pouze vyždímány do lázně a nebyly vyprané, takže skutečné množství barviva na tkaninách je ve skutečnosti nižší a pochopitelně také ne všechny polyfenolické látky v extraktu jsou barviva. Zároveň nebyly brány v úvahu změny ve složení barvicí směsi či případný rozklad polyfenolů během barvicího procesu (slepým pokusem bylo zjištěno, že během 90 minut při 70 °C došlo k velmi mírnému nárůstu obsahu polyfenolů, který odpovídal cca 0.045 g kyseliny gallové/litr lázně, což je zanedbatelná hodnota vůči počáteční koncentraci 0.602 g kyseliny gallové v lázni).

Hodnoty rychlostních konstant vypočítané z Vickerstaffovy kinetické rovnice naznačují, že polyamid se dubovou kůrou barví přibližně 5x rychleji než vlna s bavlnou – to odpovídá teorii, podle které mají taniny snahu se velmi dobře a rychle vázat na polyamid. Tomu odpovídají i hodnoty poločasů barvení – polovina rovnovážné hodnoty polyfenolů byla na polyamidu dosažena přibližně po 6 minutách, na vlně po 22 a bavlně až po více než půl hodině.

Procento vytažení fenolických látek z barvicí lázně bylo nejvyšší u vlny (v rovnovážném stavu by se teoreticky mělo blížit až k 76.5 %), ovšem je otázka, zda toto barvivo také na vlně zůstane nebo zda se postupně velká část z něj zase z vlny následným praním strhne.

Z difúzních koeficientů by se mohlo zdát, že největší afinitu měly polyfenoly k bavlněnému vláknu (nejnižší hodnota difúzního koeficientu D ze všech tří vláken svědčí pro nejmenší plochu vlákna, kterou prodifunduje barvivo/polyfenol za vteřinu, tedy nejpomalejší difúzní tok vlivem zadržování polyfenolu na povrchových vazných místech bavlněného vlákna). Nebyly však barveny tkaniny se stejně porézními ani stejně jemnými vlákny, proto nelze udělat jednoznačný závěr.

c) Stálosti

Stálosti byly zjišťovány u tkanin nabarvených nejsytějšími odstíny při koncentraci 80 g dubové kůry/litr barvicí lázně. Jak je patrné z tab.11, nejlepší stálost v praní vykazovala polyamidová tkanina obarvená dubovou kůrou (stupeň 4-5), stálost ostatních tkanin byla průměrná. K zapouštění na doprovodnou vlněnou (polyamidovou) tkaninu nedošlo ani v jednom případě. Světlostálost všech tkanin byla výborná, i po 7 hodinách osvitů výbojkou, který poškodí modrou tkaninu odpovídající stupni 4, byla barva stále beze změny, a to u všech testovaných tkanin. Obecně lze tedy stálosti všech tří tkanin (bavlna, vlna, polyamid) obarvených extraktem z dubové kůry hodnotit jako relativně vysoké, což není až tak překvapivý výsledek, vzhledem k tomu, že taniny jsou považovány za mořidla, jejichž použití by mělo vést k lepším stálostem. Nejlepší výsledky byly dosaženy barvením polyamidové tkaniny.

d) Antibakteriální účinky

Také antimikrobiální testy byly značně přesvědčivé, polyamidová tkanina obarvená extraktem z dubové kůry na „nejsilnější odstín“ (při barvení byla zvolena koncentrace dubové kůry mírně překračující experimentálně zjištěné optimum maximálního extrakčního výtěžku polyfenolů, pro maximalizaci antimikrobiálního efektu tak byla úmyslně tato barvicí lázeň „předimenzována“) vykazovala v dynamickém kontaktu s oběma testovanými bakteriálními kmeny v koncentraci 10^4 CFU/ml suspenze slušný inhibiční efekt jak krátkodobý (po 4 hodinách), tak i dlouhodobý (po 24 hodinách) v přímém kontaktu na povrchu testované tkaniny ve srovnání s polyamidovou tkaninou neobarvenou (přibližně 60% snížení počtu vykultivovaných CFU ve srovnání s blankem, tab.14). Antibakteriální efekt přetrvával ještě po 3 půlhodinových pracích cyklech, i když s každým pracím cyklem docházelo k jeho poklesu (tab.15). O něco lepší antibakteriální účinek se projevil vůči G+ bakterii *S.gallinarum* než G- bakterii *E.coli*, příčinou ale mohlo být to, že testovaný kmen *S.gallinarum* měl dle pozorování sám tendenci k úbytku a nižší životaschopnost ve srovnání s *E.coli* při delší době v samotném tekutém kultivačním médiu (TSB), natož v médiu silně rozředěném sterilním fyziologickým roztokem, kterým byly tkaniny testovány. Z toho důvodu raději nevyslovuji jednoznačné závěry ohledně lepší účinnosti taninů vůči G+ nebo G- kmenům, nicméně všeobecný a signifikantní antibakteriální účinek byl v těchto testech prokázán opakovaně.

e) Zdravotní nezávadnost

Výluhy polyamidových tkanin obarvených dubovou kůrou (i neobarvené tkaniny) také splnily přísné limity obsahu kovů vyluhovaných do simulovaného kyselého a zásaditého potu, které předepisuje vyhláška 84/2001 Sb. pro hračky a oděvy určené pro děti do 3 let. Pochopitelně se jednalo výsledky barvení konkrétním přírodním materiálem a je zřejmé, že je nutné k barvení oděvních textilií používat přírodní materiál, který nepochází ze stromů, které rostou v silně znečištěném životním prostředí nebo na kontaminované půdě.

Bioakumulace těžkých kovů, radioaktivních prvků a různých polutantů v rostlinách je dobře známa – je na ní také založena metoda fyto-remediace. Zdá se, že právě kůra stromů má tuto akumulaci schopnost ve vztahu k některým kovům – dokazuje to např. studie monitorující značně rozdílné koncentrace hexavalentního chromu v dubové kůře v závislosti na oblasti, ze které pocházely analyzované vzorky (od venkova, přes městskou aglomeraci až po blízkost bývalého závodu na zpracování chromu),²⁶⁴ ale i ve vztahu k radioaktivnímu cesiu.^{265, 266}

Také v extraktu z dubové kůry, kterou jsem používala ve svých pokusech, byla ICP analýzou naměřena ne právě stopová množství chromu, niklu a hliníku – od 0.19 do 2.6 mg/kg suchého materiálu (tab.16), přestože následné limity ve vyluzích z obarvených tkanin překročeny nebyly a použitý materiál, jak předpokládám, pocházel z ekologicky neznečištěné oblasti vzhledem k tomu, že byl zakoupen jako léčivo. Schopnost taninů ochotně se vázat s různými látkami je zde tedy dvojsečnou zbraní: na jedné straně jde o nealergenní přírodní barvivo, jehož silná vazba na polyamid je výhodou pro takto obarvenou textilii ve smyslu výborné světlostálosti a velmi dobré stálosti v praní, a schopnost taninu inhibovat růst bakterií je zde také cenným bonusem. Na druhé straně stojí přirozená schopnost taninů pro komplexaci kovů a jejich akumulaci v rostlinných tkáních, které je obsahují, což silně kontaminovaný materiál z lokality zatížené znečištěním přímo vylučuje z použití pro barvení textilií, u nichž je hlavním obchodním přínosem právě ono žádoucí „eko“ a „bio“.

Závěr:

Dubovou kůrou lze velmi dobře barvit vlněnou a polyamidovou tkaninu na různě syté hnědé až hnědooranžový odstín. I když z vytahovacích křivek vyplývá, že na vlněnou tkaninu se natáhne čtyřnásobné množství barviva než na polyamid téže hmotnosti, přesto byly hodnoty jasu obou nabarvených tkanin srovnatelné. Stálost v praní u polyamidu byla vyšší o 1.5 stupně šedé stupnice, což znamená, že velká část barviva nataženého na vlnu se také skutečně z vláken následně vypere.

Polyamidový textilní materiál obarvený extraktem z dubové kůry bez nutnosti používat mořidlové soli hodnotím velmi pozitivně jako ekologicky obarvený materiál s určitým antimikrobiálním potenciálem, výbornou stálostí a zdravotní nezávadností ve smyslu splněných limitů těžkých kovů vyluhovaných do alkalického i kyselého potu. Je vhodný například pro dětské oblečení a použití na místech silně exponovaných potem a bakteriemi – tedy ideálně pro výrobu dětských ponožek.^a Toto doporučení však má zároveň i své limity a úskalí: musí se jednat o materiál ze stromů vytěžených v ekologicky čisté oblasti nezatížené polutanty a především těžkými kovy. Při průmyslovém použití této barvicí technologie by byl nutností kontinuální monitoring obsahu těžkých kovů a dalších škodlivých látek a polutantů.

^a Křížová, H., Wiener, J.: *Colour and antibacterial properties of polyamide fabric dyed using extract from oak bark*. Autex Research Journal (in process)

^b Křížová, H.: *Závěrečná zpráva projektu CLUTEX- Biotechnologie pro textil, část E 03 (Výzkum moderního využití přírodních barviv a jejich aplikace na přírodní materiály)*, (2014)

9.3 Experimenty s réвовými výlisky

9.3.1 Extrakce anthokyanů^c

Experimentálně byla prováděna jednak extrakce kontinuální, jednak extrakce do jedné lázně. U jedné lázně byla testována vliv teploty, doby extrakce a optimální poměr výlisků a vody na výtěžnost extrakce a dále tepelná degradace anthokyanů.

Kontinuální extrakce

2 g sušených separovaných slupek z réвовých výlisků bylo dávkováno na plastové síto. Průtoková extrakce byla simulována kávovarem, v němž byla průběžně doplňovaná destilovaná voda ohřívána k varu (celkem 500 ml). Následně byl proveden odběr vzorku z každých protečených 25 ml. K 3 ml každého odebraného vzorku byla přidána kapka KCl/HCl pufru (pH 1.0) a po 15 minutách inkubace byla měřena absorbance v 515 nm.

Zjednodušeně lze pro tzv. kontinuální extrakci uplatnit vzorec pro několikanásobnou extrakci látky v soustavě se dvěma nemísitelnými kapalinami a vytřepáváním látky z jedné kapaliny do druhé (21), kde m_z je zbytkové množství extrahované látky v materiálu, m_0 je původní množství látky v materiálu, K je Nernstův rozdělovací koeficient, V_1 teoretický objem kapaliny, v němž se extrahovaná látka nachází v rostlinném materiálu, V_2 jsou stejné objemy čisté kapaliny, kterými opakovaně látku extrahujeme, i je počet těchto extrakcí.

Je zřejmé, že křivka této funkce má klesající průběh a limitně se přibližuje k nule a že s počtem extrakčních kroků sice roste výtěžnost extrakce, ale 100% extrakce nelze dosáhnout. V reálu jsou efektivní výtěžky získávány maximálně 3-5 stupňovou extrakcí.

$$m_z = m_0 \cdot \left(\frac{V_1}{V_1 + K \cdot V_2} \right)^i \quad (21)$$

Extrakce do jedné lázně

Lázněová extrakce byla prováděna v nerezových patronách barvicího aparátu Ahiba Nuance Eco (Datacolor) s regulací ohřevu, času a otáček, kam byly dávkovány sušené výlisky a destilovaná voda. K odebraným vzorkům byla opět přidána kapka KCl/HCl pufru pro zvýraznění barevnosti anthokyanů, které jsou po kratší inkubaci v silně kyselém prostředí vlivem protonizace flavanového skeletu převedeny na jasně červené flavyliové soli s absorpčním maximem kolem 515 nm. U těchto vzorků byla stanovena absorbance při 515 nm jednobarevným absorpčním VIS spektrofotometrem Helios Epsilon (Fisher Scientific). U některých vzorků byla proměřována absorbance extraktů s neupraveným pH při 528 nm.

Vliv teploty na výtěžnost

Nerezové patrony barvicího aparátu Ahiba byly naplněny 2 g sušených slupek z réвовých výlisků a 200 ml destilované vody. Po dobu 1 hodiny byla každá z patron v samostatném cyklu vystavena ohřevu s rotacemi 20 otáček/min., a to při teplotách 20, 40, 60, 80, 100 a 120 °C (patrona s extrakcí při 20 °C byla vystavena pouze rotaci). Ke vzorkům, které byly na konci extrakčních cyklů odebrány z každé patrony, byla opět přidána kapka KCl/HCl pufru a proměřena absorbance při 515 nm.

Vliv doby extrakce na výtěžnost

Nerezová patrona barvicího aparátu Ahiba byla naplněna 2 g sušených slupek z révových výlisků a 200 ml destilované vody. Byl nastaven extrakční cyklus při 80 °C, s rychlostí rotace patron 30 otáček /min. V časech 5, 10, 20, 30, 40, 60 a 100 minut od dosažení teploty 80 °C byly z patrony odebírány vzorky ke spektrofotometrii. U těchto vzorků byla měřena absorbance v maximu 528 nm.

Vliv poměru výlisků a vody na výtěžnost

Do nerezových patron barvicího aparátu Ahiba bylo dávkováno 0.5, 1.5, 2.5 a 4 g sušených výlisků do objemů 100 ml destilované vody, což odpovídá koncentraci 5, 15, 25, a 40 g/litr extrakční lázně. Extrakce probíhala při 90 °C a rotaci 30 otáček /min. po dobu 50 minut. Poté byl odebrán vzorek z každé patrony, proměřena VIS spektra a dále vzorky naředěné v poměru 1:1 destilovanou vodou (nejvyšší koncentrace byly již mimo měřicí rozsah spektrofotometru) byly proměřeny na spektrofotometru. Byla zaznamenána absorbance v maximu 528 nm.

9.3.2 Degradace anthokyanů

Tepelná degradace anthokyanů

Krátkým varem (15 min.) bylo vyextrahováno 18 g révových výlisků do 100 ml destilované vody, tento extrakt byl v hermeticky uzavřené skleněné nádobě vystaven několikahodinovému varu na vodní lázni a v pravidelných intervalech (0, 1, 2 a 4 hodiny) byly odebírány vzorky.

Do dvou 10 ml odměrných baněk bylo pipetováno po 2 ml filtrovaného extraktu z výlisků, objem byl doplněn do 10 ml pufrů a tyto roztoky byly ponechány určitý čas ve tmě, aby se převedly jednotlivé formy anthokyanů: na flavyliové (pH 1.0), respektive na karbinolové soli (pH 4.5). Následně byly proměřeny absorbance v absorpčním maximu pro vzorek převedený do flavyliové formy s maximální barevností ($A_{1,0}$) a do „bezbarvé“ karbinolové formy ($A_{4,5}$). V těchto vzorcích byl stanovován degradační index anthokyanů (DI), který se počítá podle vzorce (1) (viz str.17).

Degradace anthokyanů v zásaditém prostředí^d

Alkalické prostředí je příčinou nestability anthokyanů a vede k jejich různě rychlé degradaci s rozštěpením pyranového kruhu a vzniku žlutého chalkonu. Čím silnější je zásadité prostředí, tím rychleji tato přeměna probíhá. Na šťávě z čeného bezu je demonstrována tato rychlost degradace, která je z pohledu chemické kinetiky řešena jako chemická reakce 1. řádu. Byly měřeny změny absorbance v čase, a protože je absorbance dle Lambert-Beerova zákona přímo úměrná koncentraci, je možné koncentraci v kinetické rovnici rozkladu anthokyanů nahradit absorbancí (22).

$$\frac{-dA_0}{dt} = kA \quad (22)$$

Po separaci proměnných (23) a integraci dostáváme rovnici (24):

$$\int \frac{-dA_0}{A} = -k \int dt \quad (23)$$

$$\ln A = -kt + C \quad (24)$$

Integrační konstantu vypočteme z hodnoty absorbance v čase $t=0$ (25)

$$C = \ln A_0 \quad a \quad \ln A = -kt + \ln A_0 \quad (25)$$

Takže integrační konstanta je (26)

$$k = \frac{\ln A_0 - \ln A}{t} \quad (26)$$

Poločas degradace je vyjádřen vztahem (27)

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (27)$$

k ... rychlostní konstanta [s^{-1}]

A ... absorbance

A_0 ... počáteční absorbance v čase t_0

t ... čas [s]

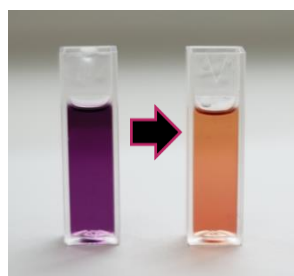
$t_{1/2}$... poločas rozkladu anthokyanů, tj. doba, za kterou je polovina anthokyanů v roztoku rozložena

Degradace anthokyanů a změny v antioxidační aktivitě révových polyfenolů vlivem UV-A záření^e

Jak bylo uvedeno v kapitole 9.1.2 *Kvantifikace obsahu polyfenolů a taninů*, na celkovém obsahu polyfenolů v révových výliscích se podílí menší část slupky a větší část jádérka. Zatímco celkové polyfenoly ve výliscích byly stanoveny v množství 3.2 hm.% ze suchého materiálu, v suchých slupkách je tento obsah 2.2 % a v jádérkách 5.3 % suchého materiálu. Jednoduchým předpokladem je, že v jádérkách většina tohoto obsahu připadá na kondenzované oligomerní a polymerní taniny, ve slupkách jsou významným zdrojem polyfenolů anthokyany, přestože i ve slupkách jsou přítomny taniny. Také pokud jde o antioxidační vlastnosti, vykazují tyto dvě skupiny látek odlišnou schopnost a účinnost ve zhášení radikálů.

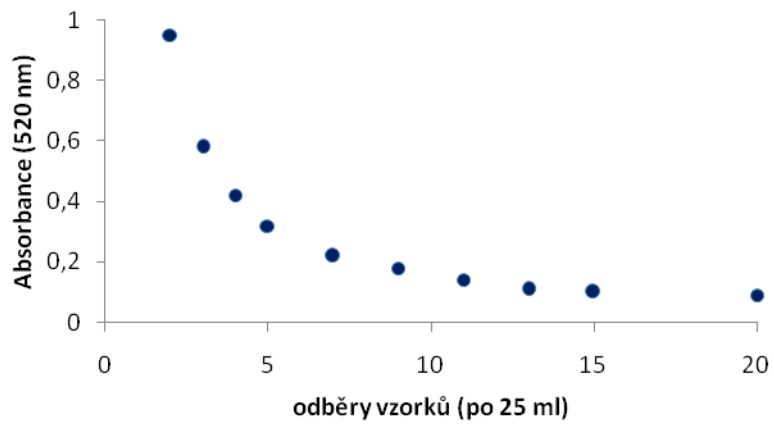
2 g suchých slupek a 2 g suchých jáderek byly extrahovány odděleně ve 200 ml vody při 95 °C po dobu 30 (slupky) a 60 minut (jádérka). Každý extrakt byl dávkován po 30 ml do 4 kádinek, ty byly zakryty fólií propouštějící UVA záření, kádinky byly chlazeny ve vodní lázni a tři ze čtyř kádinek byly vystaveny po dobu 6, 10 a 24 hodin UVA záření. Po této době byl u extraktů zjišťován úbytek antioxidační aktivity pomocí radikálu DPPH (viz kapitola 8.3.2 *Metody - Analýza extraktů a obarvených tkanin – Chemická laboratorní analýza*). Čtvrtý díl nebyl ozařován a posloužil jako srovnávací vzorek s původní antioxidační aktivitou.

8 mg radikálu DPPH bylo rozpuštěno ve směsi acetátového pufru a etanolu k výsledné absorbanci 1.3 při 515 nm. Ke 2 ml tohoto roztoku bylo dávkováno vždy 200 mikrolitrů extraktu ze slupek nebo 100 mikrolitrů extraktu z jáderek a byl sledován čas, za který klesla absorbance tohoto roztoku o 1 absorpční jednotku, tedy z 1.3 na 0.3. Každé měření bylo provedeno 3x a průměrný čas deaktivace radikálu DPPH, při které se mění barva roztoku z fialové na žlutou (obr.55), byl zaznamenán. Zároveň byly měřeny změny v obsahu polyfenolů metodou stanovení TPF pomocí Folinova činidla a u extraktu ze slupek byl měřen také pokles obsahu barviva.

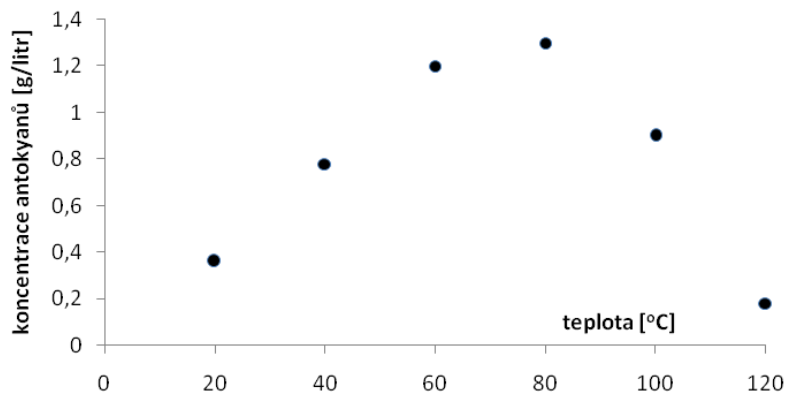


Obr.55 Barevné změny doprovázející „zhášení“ radikálu DPPH

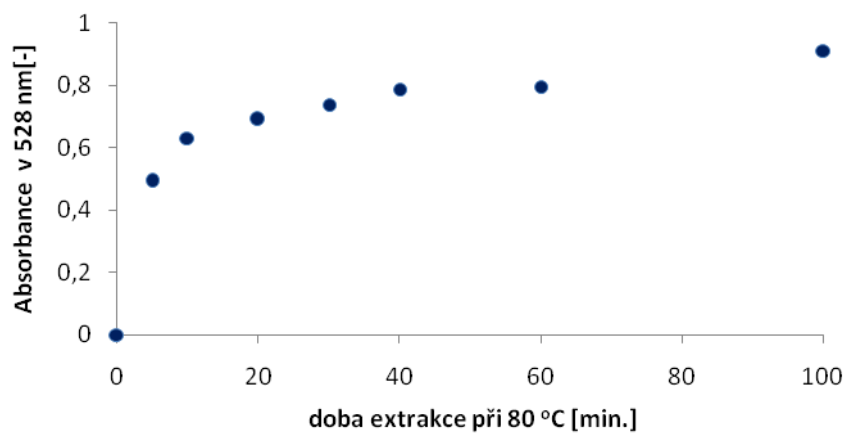
Výsledky:



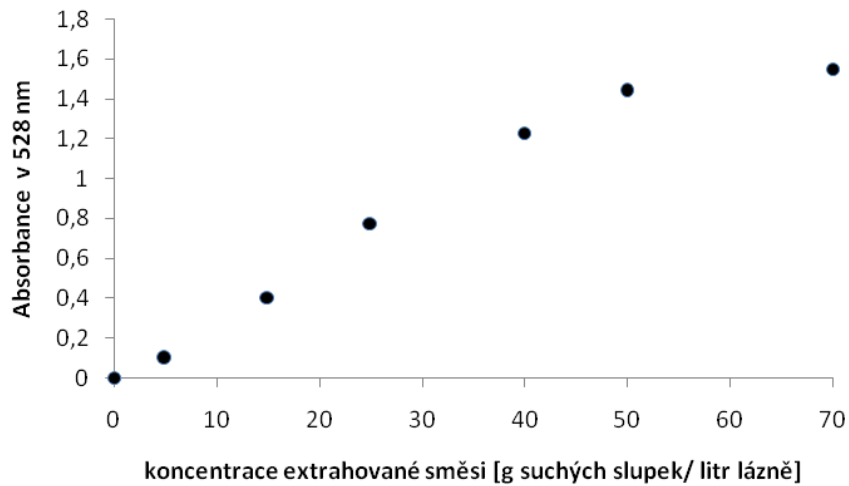
Obr.56 Průběh kontinuální extrakce anthokyanů



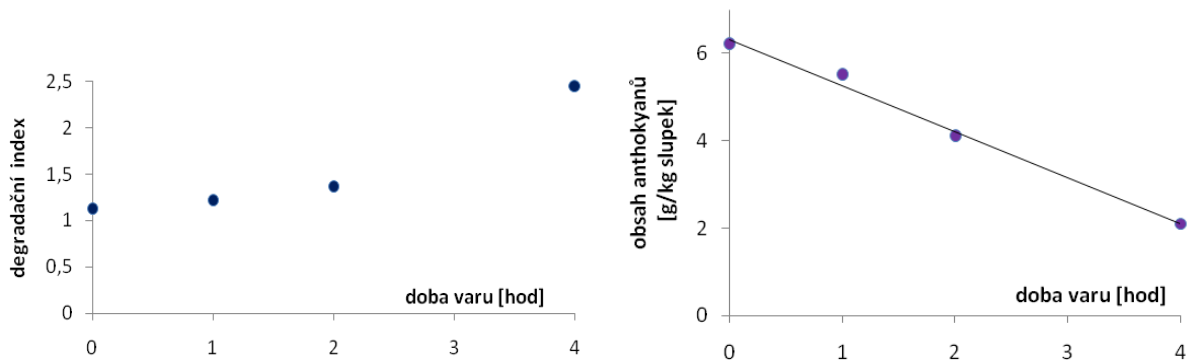
Obr.57 Nárůst absorbance při láznové extrakci anthokyanů v závislosti na teplotě



Obr.58 Nárůst absorbance při láznové extrakci anthokyanů v závislosti na době extrakce



Obr.59 Nárůst absorbance při lážňové extrakci anthokyanů v závislosti na koncentraci extrahovaného materiálu (zde: sušené slupky z révy, které byly ze směsi výlisků separovány)

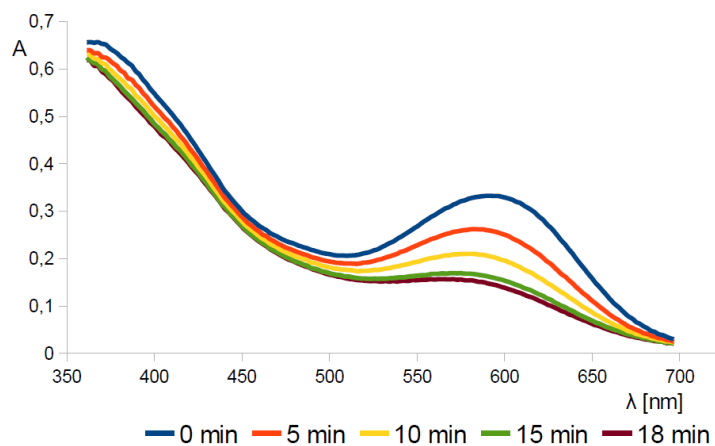


Obr. 60 Vývoj degradačního indexu anthokyanů v průběhu několikahodinového varu extraktu z výlisků

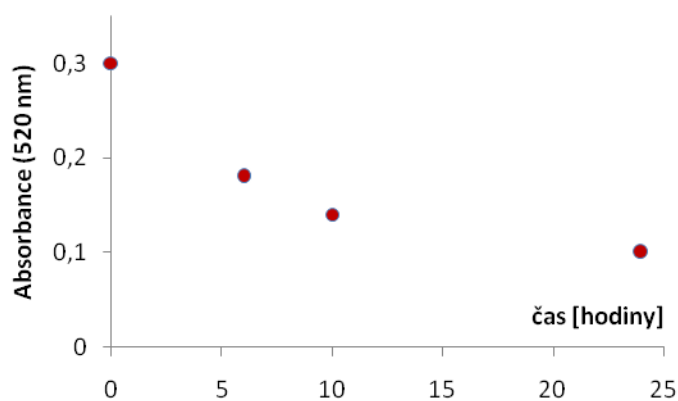
Obr.61 Pokles obsahu anthokyanů v roztoku během varu

Tab. 17 Kinetika rozkladu anthokyanů z černého bezu v zásaditém prostředí

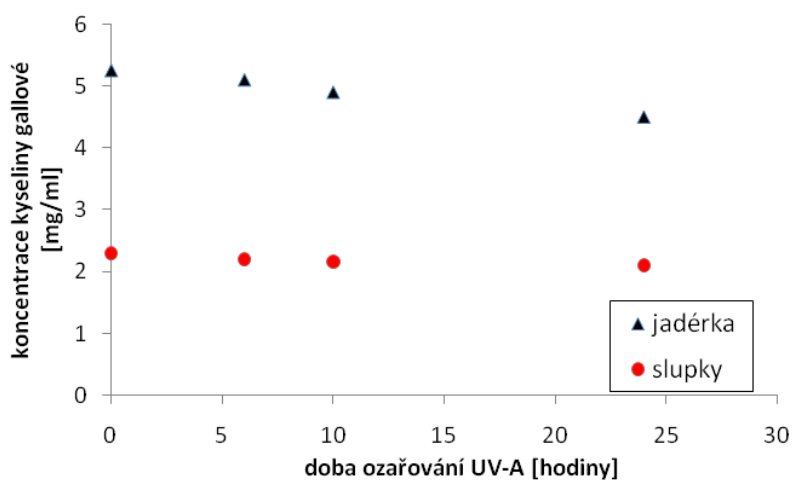
Čas [min]	pH 11	pH 12	pH 13
	A_{520}	A_{520}	A_{520}
0	0.1989	0.2104	0.2031
5	0.1973	0.1913	0.1327
10	0.1955	0.1740	0.0871
rychl. konstanta [s^{-1}]	$2.57 \cdot 10^{-5}$	$3.20 \cdot 10^{-4}$	$1.42 \cdot 10^{-3}$
poločas rozkladu	7.5 h	36 min.	8 min.



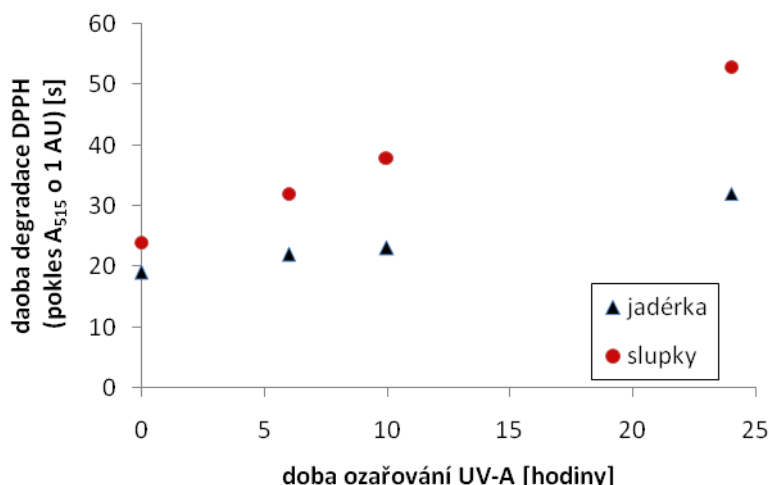
Obr.62 Postupné odbarvování šťávy z černého bezu při pH 12



Obr.63 Pokles obsahu barviva v extraktu z révových slupek v průběhu ozařování UV-A (barevnost měřena po 30 minutách od přidání KCl/HCl pufru pH 1 při 520 nm)



Obr.64 Pokles obsahu celkových polyfenolů v extraktu ze slupek a jadérek révy při expozici UV-A zářením



Obr.65 Prodlužování doby zhášení radikálu DPPH extrakty ze slupek a jaderék révy vystavených různě dlouhé době UV-A záření

Diskuze:

a) Extrakce

Jak je patrné z obr.56, průběh kontinuální extrakce anthokyanů odpovídal předpokladu limitního přiblížení k nulové zbytkové hodnotě barviva v extrahovaném materiálu. Zhruba od 6. extrakčního cyklu bylo množství získaného barviva již velmi malé.

Přestože absolutní koncentrace anthokyanů v extraktech nebyla zjišťována, je zřejmé, že kontinuální (průtoková) extrakce je metoda efektivnější. Vyžaduje však speciální průtokové extrakční zařízení, větší spotřebu vody i energie, následné zkoncentrování lázně a dvoufázový proces pro barvení textilií. Pro potřeby domácího nebo manufakturního barvení textilií je možné používat zjednodušený jednofázový proces, kdy probíhá extrakce barviva z rostlin současně s barvením textilie v téže nádobě a lázni. I z tohoto pohledu je lážňový způsob praktičtější, levnější i jednodušší.

Pro extrakci anthokyanů z výlisků byla zjištěna optimální teplota vodné lázně asi 80 °C (obr.57). Optimální doba lážňové extrakce činila při teplotě 80 °C přibližně 40 minut (obr.58), během kterých bylo vyextrahováno nejvíce anthokyanů. Po této době již zhruba do 1 hodiny množství barviva rostlo minimálně a další prodlužování doby extrakce bylo již neefektivní. K podobnému výsledku (45 minut) dospěli např. i autoři studie³⁴, kteří optimální výtěžek barviva z červených hroznů experimentovali na hodnotě jasu L* vlněné tkaniny obarvené extrakty s různými časy extrakce za varu (95 °C). V jiné studii³⁵, kde byla také prováděna extrakce barviva z výlisků modré révy za varu do 1 hodiny, dospěli autoři k obdobnému výsledku na vzorcích odebíraných po 10 minutách extrakce a měřených spektrofotometricky.

Měření absorbance těchto extraktů potvrdilo rychlý nárůst barevnosti extraktu během prvních 10-30 minut, s následným pozvolným růstem až do 1 hodiny. Obr.58 potvrzuje, že i po této době skutečně dochází k extrakci dalších anthokyanů z materiálu a k nárůstu absorbance extraktu, ten už ale není tak výrazný vzhledem k další spotřebě energie.

Optimální extrakční poměr výlisky : objem lázně byl experimentován na separovaných sušených révových slupkách a jejich koncentrace 50 g v 1 litru extrakční lázně (při teplotě 90

°C po dobu 50 minut) se dle grafu na obr.59 jeví jako optimální – další zvyšování množství extrahovaného materiálu v tomto objemu již nebyl příliš efektivní. Je ale třeba si uvědomit, že slupky tvoří 60 hm.% celkového usušeného materiálu (výlisků), tedy limitních 50 g suchých slupek v litru odpovídá přibližně 80 gramům suchých výlisků. Při použití čerstvého či zmrazeného materiálu a při sesychacím poměru 2.5 : 1 je potom optimální poměr 200 g výlisků na 1 litr extrakční lázně.

b) Tepelná degradace

Zjistila jsem, že anthokyany v révových výliscích jsou poměrně odolné vůči tepelné degradaci, protože k poklesu množství anthokyanů v roztoku pod polovinu původní hodnoty dochází až zhruba po 3 hodinách varu. Proto lze při barvení výlisky provádět i dvoufázový proces (1. extrakce barviva, 2. barvení textilie za varu) bez větších ztrát účinné barvicí složky. I když se pro barvení textilií (např. vlna, bavlna, polyamid) používá nejčastěji barvení za varu po dobu cca 1 hodiny, což mírně překračuje zjištěné extrakční optimum anthokyanů, z grafů na obr.60 a 61 je patrné, že za těchto podmínek dochází jen k malému poklesu obsahu anthokyanů.

Jak ukazuje reakční kinetika v tab.17, rychlost degradace anthokyanů roste s rostoucím pH prostředí. Zatímco absorbance šťávy z plodů černého bezu se při pH 10 v průběhu 25 minut nezměnila v průběhu celého VIS spektra, při pH 12 již docházelo v tomto časovém intervalu k postupnému snižování absorbance v absorpčním maximu 592 nm, (modrozelená barva pomalu slábla, obr.62), při pH 13 docházelo k rychlé změně už v průběhu prvních 3 minut, kdy původně tmavozelený roztok se změnil na světlezelený až žlutozelený vlivem postupného rozkladu chinoidní báze a vzniku chalkonů. S rostoucí alkalitou prostředí se oxidativní rozklad anthokyanů urychluje a i za normální teploty proběhne během několika minut. Jednotlivé anthokyany však mají různou odolnost v zásaditém prostředí, protože se tu mj. uplatňuje i ochranný charakter kopigmentových nebo jen ve šťávě či extraktu volně přítomných organických kyselin.

c) Světelná degradace

Obr.63 a 65 ukazují, že po 24 h expozice UV-A zářením došlo u extraktu ze slupek modré révy odrůdy Fratava sice k 70 % poklesu barviva, ale jen k 8 % poklesu celkových polyfenolů. To dokazuje, že ve slupkách jsou také přítomny taniny, i když jejich složení je trochu odlišné, než v jádérkách (v jejich složení převládá prodelfinidin a epigallokatechin, které v jádérkách nejsou přítomny).²⁶⁷ Celkové polyfenoly v extraktu z jáderek poklesly o 16%, což naopak zase může svědčit o přítomnosti mono- a oligomerních polyfenolů, které tento výsledek ovlivňují.

Vzhledem k tomu, že celkový obsah polyfenolů ve slupkách byl už na počátku experimentu zhruba poloviční než v jádérkách (obr.64), bylo také nutné použít dvojnásobné množství extraktu ze slupek k deaktivaci srovnatelného množství radikálu DPPH. Původní extrakt ze slupek (200 µl) odbarvil 2 ml roztoku DPPH (520 nm) za 24 sekund, 100 µl extraktu z jáderek za 19 sekund. 24hodinová expozice UVA záření zvýšila tento čas u extraktu ze slupek o 28 sekund, u extraktu z jáderek o 14 sekund.

Experiment s UVA zářením prokázal jednak zhruba dvojnásobné množství vodou extrahovatelných polyfenolů v jádérkách ve srovnání se slupkami révy Fratava, dále malou odolnost anthokyanů vůči UVA záření (po 24 h expozice kleslo množství barviva o 70 %), dá se tedy očekávat, že tato nestabilita se projeví i nízkou světlostalostí obarvených tkanin.

Zároveň se ale prokázala značná antioxidační či spíše antiradikálová síla kondenzovaných taninů obsažených v révě, především v jadéřkách.

Závěr:

Barevné anthokyaniny a další polyfenolické látky ve výliscích z modré révy lze velmi dobře extrahovat pouhým varem anebo optimálně při teplotě 80 °C po dobu 1 hodiny, i když větší část barevných látek přechází do roztoku už v průběhu prvních 20-30 minut.

Pro maximální zisk barviva při láznovém barvení lze doporučit poměr 200 g čerstvých, respektive 80 g suchých révových výlisků na 1 litr extrakční lázně a barvení může být prováděno buď jednostupňově spolu s extrakcí, anebo až následně po extrakci, protože tepelná odolnost anthokyanů se ukázala být poměrně velká. Naproti tomu expozice UVA zářením po dobu 24 hodin stačila zlikvidovat 70% barevných pigmentů v roztoku, což nesevčí pro velkou světelnou stabilitu anthokyanů – jak uvidíme dále, tato vlastnost se projeví i při barvení (především nenamořených) tkanin.

^c Křížová, H.: *Optimalizace podmínek vodné extrakce anthokyanů z révových výlisků pro účely ekologického barvení textilií*. WASTE FORUM, Vol.1 (2015), ISSN: 1804-0195, s. 12-19

^d Křížová, H., Wiener, J.: *Colour changes and instability of anthocyanins*. ACC Journal, XVIII/1, Issue A, (2012), ISSN: 1803-9782, s. 30-41

^e Křížová, H.: *Changes in the antioxidant activity of polyphenols from grape pomace after interaction with UV radiation*. ACC Journal, Vol. 21, Issue 1 (2015), ISSN: 1803-9782, s. 70-76

9.3.3 Barvení réвовými výlisky a stálostí *d, f, g, h, i, j*

Barvení vlněné tkaniny při různém pH lázně

100 g zmražených čerstvých výlisků odrůdy Fratava bylo 30 minut povařeno s 600 ml destilované vody k získání koncentrovaného vodného extraktu anthokyanů, což je doba postačující pro vodnou extrakci maximálního množství anthokyanů. Po přecezení byla tato barvicí lázeň rozdělena na třetiny, jedna část byla okyselena kyselinou octovou a několika kapkami kyseliny sírové na pH 2.5, další část byla ponechána bez úpravy pH (přirozené pH 3.9) a poslední část byla přidávkem malého množství uhličitanu sodného upravena na pH 4.6. Tři proužky vlněné tkaniny o hmotnosti 1.5 g byly předmořeny po dobu 2 hodin ve 100 ml roztoku taninu (3 g/litr), další tři byly předmořeny stejným způsobem ve 100 ml roztoku kamence (3g/litr) - na počátku zahřáto k varu a ponecháno v chladnoucí lázni, poslední část byla ponechána bez moření.

Barvení bylo provedeno lážňovým způsobem při poměru lázně 1:50 (1 g textilie/50 ml lázně) v patronách barvicího aparátu Ahiba po dobu 45 minut při teplotě 95 °C, při rychlosti 15 otáček/minutu. Po skončení barvicího cyklu byly vzorky ponechány v chladnoucí lázni další hodinu. Následoval oplach tkanin v destilované vodě a vysušení při pokojové teplotě.

Výsledky:



Obr.66 Zleva doprava: nemořená tkanina - tkanina mořená taninem - tkanina mořená kamencem.
Shora dolů: barvení výlisky při pH 2.5 - 3.9 - 4.6

Je zajímavé, jak velké barevné rozdíly jsou mezi tkaninami barvenými v nevelkém rozmezí pH 2.5 až 4.6 – to odráží barevné změny anthokyanů, které jsou na změnu kyselosti prostředí velmi citlivé.

Jak je vidět na obr.66, nejslabší vybarvení mají tkaniny předmořené taninem (prostřední sloupec), tkaniny předmořené kamencem (pravý sloupec) jsou vybarveny nejsilněji. Na všech vzorcích je patrné, že v kyselém prostředí je dosaženo nejjasnějšího růžového odstínu. Se vzestupem pH se posouvá odstín přes fialovou k šedé, u kamencem mořených tkanin pozorujeme výrazný bathochromní posun vlivem vzniklého komplexu s hlinitou solí.

Měření $L^*a^*b^*$ hodnot všech vzorků z obr.66 a výpočet odstínových odchylek ozařovaných zón oproti neozářované tkanině jsou uvedeny v tabulkách 15 až 17.



Obr.67 Shora dolů jsou patrné zóny vystavené 0, 2, 4 a 8 h UV záření. Zleva doprava: trojice barvené při pH 2.5 - 3.9 - 4.6, pořadí vzorků v každé trojici: nemořeno - mořeno taninem - mořeno kamencem

Tab.18 Hodnoty $L^*a^*b^*$ a odstínové změny (GSR) při UV osvitu **nemořené** tkaniny a barvené při různém pH

UV [hod.]	pH 2.5					pH 3.9					pH 4.6				
	L*	a*	b*	ΔE	GSR	L*	a*	b*	ΔE	GSR	L*	a*	b*	ΔE	GSR
0	58.4	16.1	0.5	-	-	58.4	7.6	-2.8	-	-	71.0	2.8	2.4	-	-
2	64.6	14.2	3.3	7.06	2	62.4	7.1	1.4	5.82	2	76.2	3.3	3.2	5.09	2-3
4	66.7	13.7	5.2	9.83	1-2	65.9	7.1	4.3	10.3	1-2	79.7	3.3	3.3	6.78	2
8	70.6	13.5	7.6	14.4	1	67.8	6.1	6.6	13.4	1	82.2	3.8	5.7	11.7	1

Tab.19 Hodnoty $L^*a^*b^*$ a odstín. změny (GSR) při UV osvitu tkaniny **mořené taninem** a barvené při různ. pH

UV [hod.]	pH 2.5					pH 3.9					pH 4.6				
	L*	a*	b*	ΔE	GSR	L*	a*	b*	ΔE	GSR	L*	a*	b*	ΔE	GSR
0	60.4	15.1	3.3	-	-	60.7	5.7	1.9	-	-	63.9	2.4	0.9	-	-
2	68.3	14.6	7.1	5.16	1-2	65.1	6.6	5.7	5.88	2	64.7	2.4	5.2	4.37	2-3
4	71.8	13.7	8.0	12.41	1	66.7	7.1	7.3	8.20	1-2	69.8	2.8	6.1	7.87	2
8	72.6	13.7	9.9	13.9	1	72.2	7.6	9.4	13.9	1	72.3	3.3	7.6	10.8	1-2

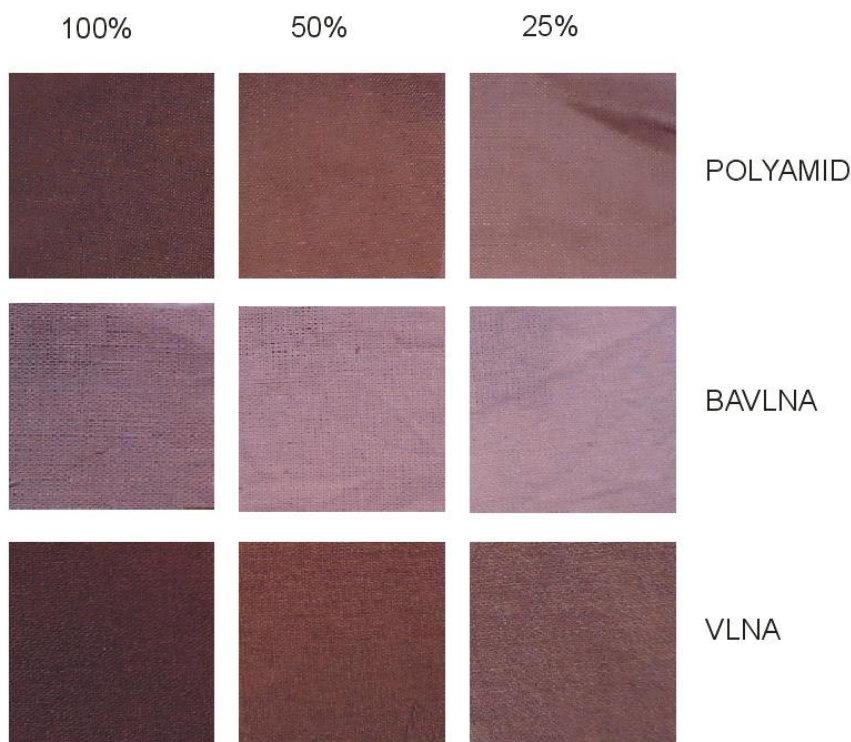
Tab.20 Hodnoty $L^*a^*b^*$ a odstín. změny (GSR) při UV osvitu tkaniny **mořené kamencem** a barvené při různ. pH

UV [hod.]	pH 2.5					pH 3.9					pH 4.6				
	L*	a*	b*	ΔE	GSR	L*	a*	b*	ΔE	GSR	L*	a*	b*	ΔE	GSR
0	42.4	17.5	8.5	-	-	39.2	8.0	6.1	-	-	38.8	6.6	4.7	-	-
2	43.5	17.5	10.4	2.20	3-4	40.2	8.5	6.6	1.22	4-5	39.4	6.6	5.7	1.17	4-5
4	45.8	16.5	11.8	4.84	2-3	40.8	8.5	7.1	1.95	4	40.0	6.6	6.4	2.08	4
8	50.5	16.1	12.5	9.14	1-2	42.8	8.5	7.6	3.93	3	40.5	7.1	6.6	2.60	3-4

Barvení vlny, bavlny a polyamidu bez moření

Všechny tři druhy tkanin byly barveny lázněm způsobem v barvicím aparátu Ahiba při poměru lázně 1:50, rychlost ohřevu 4 °C/min., 30 minut barvení při 95 °C, následně 2 hodiny v chladnoucí lázni, s rotací patron 20 ot./min., barveno koncentracemi 20 – 40 – 80 g suchých výlisků/litr lázně (dále označeno jako 25, 50 a 100%). Po barvení následovalo praní při teplotě 40 °C po dobu 30 minut při rychlosti 30 ot./min.

Výsledky:



Obr.68 Tkaniny barvené anthokyany (extraktem z výlisků z modré révy, odrůda Fratava), 100%, 50% a 25 % odpovídá obsahu 80, 40 a 20 g suchých výlisků/litr barvicí lázně

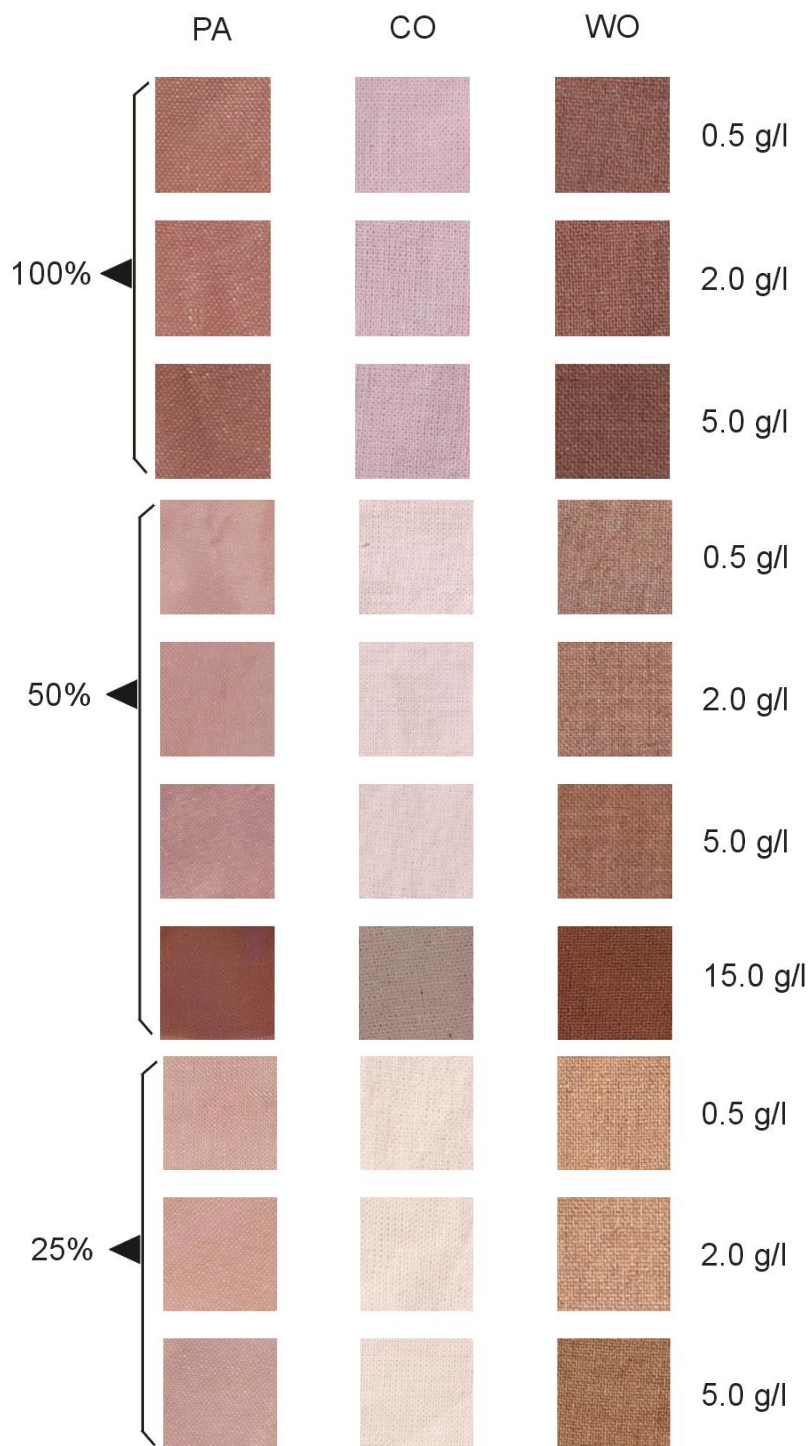
Tab.21 $L^*a^*b^*$ hodnoty tkanin z obr.68 (pozn. PA = polyamid, CO = bavlna, WO = vlna)

Tkanina	Koncentr. barviva	L^*	a^*	b^*
PA	100%	22.4	6.1	0.9
PA	50%	37.0	7.4	2.3
PA	25%	45.1	7.6	1.9
CO	100%	52.9	7.1	-1.4
CO	50%	60.0	7.6	-1.4
CO	25%	66.7	6.1	-1.9
WO	100%	18.2	8.2	1.4
WO	50%	29.3	9.3	3.3
WO	25%	45.6	8.5	2.8

Barvení vlny, bavlny a polyamidu s předmořením

Vlněná, bavlněná i polyamidová tkanina byly předmořeny kamencem v koncentracích 0.5 – 2.0 – 5.0 a 15.0 g/litr při 15 min. varu s následným chladnutím a ponecháním tkanin v mořicí lázni celkem 12 hodin. Tkaniny byly následně barveny ve stejném teplotním a časovém režimu jako předchozí tkaniny bez moření, ale v polovičních koncentracích výlisků v barvicích lázních (10 – 20 – 40 g suchých výlisků/1 litr lázně, dále označeno jako 25, 50 a 100 %).

Výsledky:



Obr.69 Tkaniny barvené výlisky z modré révy (předmořené kamencem, 0.5 – 2.0 – 5.0 – 15.0 g/litr)

Tab.22 L*a*b* hodnoty tkanin z obr.69 (pozn. PA = polyamid, CO = bavlna, WO = vlna)

% původní koncentrace	Materiál tkaniny	Koncentrace mořidla [g/l]	L*	a*	b*
100%	PA	0.5	51.4	9.0	5.7
100%	PA	2.0	52.4	9.9	5.2
100%	PA	5.0	47.5	9.9	5.6
50%	PA	0.5	66.1	7.1	2.8
50%	PA	2.0	63.4	8.1	2.8
50%	PA	5.0	58.4	8.0	2.4
50%	PA	15.0	37.2	11.3	6.1
25%	PA	0.5	67.2	7.1	4.7
25%	PA	2.0	66.5	7.6	5.2
25%	PA	5.0	63.8	6.6	2.8
100%	CO	0.5	73.7	6.1	-1.4
100%	CO	2.0	74.5	6.6	-1.4
100%	CO	5.0	73.8	6.6	-1.4
50%	CO	0.5	88.9	3.8	0.9
50%	CO	2.0	86.5	4.3	0.9
50%	CO	5.0	85.1	3.8	0.9
50%	CO	15.0	61.2	5.2	3.3
25%	CO	0.5	91.4	2.4	2.8
25%	CO	2.0	90.2	2.8	2.8
25%	CO	5.0	89.2	2.8	2.8
100%	WO	0.5	48.7	8.1	5.2
100%	WO	2.0	40.8	9.0	5.2
100%	WO	5.0	36.1	8.5	5.2
50%	WO	0.5	53.7	7.1	5.7
50%	WO	2.0	51.0	7.2	5.7
50%	WO	5.0	44.5	8.3	6.1
50%	WO	15.0	36.1	11.3	9.1
25%	WO	0.5	67.2	7.1	9.4
25%	WO	2.0	63.1	7.1	9.0
25%	WO	5.0	58.8	7.6	10.4

Stálosti tkanin obarvených anthokyany

Tab.23 Stálosti nemořených tkanin obarvených révovými výlisky v koncentraci 40 g suchých výlisků/ litr (středně silné vybarvení z obr.69)

Materiál	Stálost v praní (stupeň šedé stupnice)	Stálost na světle (stupeň modré stupnice)
PA	4 - 5	3 - 4
CO	1 - 2	2
WO	3 - 4	3 - 4

9.3.4 Zdravotní nezávadnost^b

Obarvené a neobarvené vzorky všech tří tkanin byly také testovány z hlediska zdravotní nezávadnosti na obsah kovů ve vyluzích z těchto tkanin, podobně jako v kapitole 9.2.4.

Zároveň byla provedena povrchová prvková analýza tkanin pomocí EDS, která je součástí elektronového mikroskopu UHR SEM Ultra Plus (Carl Zeiss).

Tab.24 Obsah kovů v extraktech a ve vyluzích z obarvených i neobarvených tkanin bez moření, (ICP analýza), hodnoty jsou v mg a µg/kg tkaniny

Tkanina	Barvení	Ni [µg/kg]	Pb [µg/kg]	Cr [mg/kg]	Cu [mg/kg]	Co [µg/kg]	Al [mg/kg]	Cd [µg/kg]
dest.voda	-	<10	<0.01	<0.002	0.03	<10	<0.01	<2
extrakt	réva 1 ^{x)}	<250	0.15	0.05	0.18	<10	0.75	<100
extrakt	réva 2 ^{xx)}	-	-	0.08	0.047	-	0.675	<50
alkal.pot	- (blank)	2.1	0.12	0.02	0.01	0.54	0.02	0.04
PA	- (blank)	116.4	37.9	0.88	0.71	24.66	0.57	3.8
CO	- (blank)	137.9	73.2	0.85	0.94	25.51	0.59	2.6
WO	- (blank)	169.9	14.0	0.87	1.78	25.91	0,5	1.2
PA	réva	136.4	7.7	0.88	2.61	29.07	0.84	2.4
CO	réva	182.4	47.2	0.89	6.44	28.02	0.64	4.6
WO	réva	137.9	7.2	0.96	2.16	28.87	0.89	1.6
kys.pot	- (blank)	4.09	0.67	0.018	0.12	0.22	0.016	0.06
PA	- (blank)	205.9	66.7	0.93	5.57	10.57	1.05	4.5
CO	- (blank)	235.9	35.9	0.92	5.87	13.52	1.51	3.6
WO	- (blank)	491.9	16.8	0.82	6.35	17.07	<0.50	4.4
PA	réva	276.4	18.9	0.94	8.45	12.27	1.10	4.5
CO	réva	314.4	28.1	1.02	13.86	12.77	0.70	9.2
WO	réva	254.4	28.7	0.82	6.02	12.87	2.08	3.9

Pozn.: ^{x)} vztaženo na 1 kg sušených výlisků (Fratava)

^{xx)} vztaženo na 1 kg sušených slupek (Svatovavřínecké)

Hodnoty kovů (u chromu, mědi a hliníku v miligramech, u niklu, olova, kobaltu a kadmia v mikrogramech) jsou přepočteny na kilogram tkaniny, respektive u extraktů je obsah kovů vztažen na kilogram sušeného barvicího materiálu extrahovaného varem. U destilované vody, alkalického a kyselého potu je uvedena koncentrace kovu v daném roztoku (mg nebo µg/litr). Výlisky ze dvou různých vlnařských zdrojů byly vyvářeny v destilované vodě po dobu 10 minut.

Tab.25 EDS analýza obsahu některých kovů v povrch.vrstvě tkanin obarvených anhtokyany z révových výlisků odrůdy Fratava v koncentraci 80 g suchých výlisků/litr a mořených kamenecem v koncentraci 0 – 15 g/litr

Materiál	Moření [g/l]	Al [atom.%]	Cr [atom.%]	Ni [atom.%]	Cu [atom.%]	Zn [atom.%]
PA	-	0.00	0.01	0.00	0.11	0.05
CO	-	0.04	0.04	0.00	0.09	0.00
WO	-	0.02	0.05	0.02	0.05	0.00
PA	0.5	0.00	0.00	0.00	0.02	0.03
CO	0.5	0.04	0.05	0.00	0.00	0.00
WO	0.5	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00
PA	2.0	0.02	0.04	0.00	0.01	0.02
CO	2.0	0.05	0.00	0.00	0.01	0.09
WO	2.0	0.07	0.00	0.02	0.02	0.00
PA	5.0	0.05	0.00	0.06	0.00	0.02
CO	5.0	0.04	0.10	0.00	0.00	0.04
WO	5.0	0.09	0.00	0.03	0.00	0.00
PA	15.0	0.28	0.02	0.00	0.01	0.06
CO	15.0	0.78	0.00	0.01	0.00	0.00
WO	15.0	0.22	0.00	0.00	0.15	0.11

Tab.26 pH vodných výluhů obarvených tkanin

Tkanina	Barvení	Předmoření	pH
destilovaná voda	-	-	5.65
kamenec (5 g/l)	-	-	3.85
extrakt z výlisků	-	-	3.70
PA	révové výlisky	-	6.02
CO	révové výlisky	-	6.25
WO	révové výlisky	-	3.63
PA	révové výlisky	kamenec 5g/litr	5.47
CO	révové výlisky	kamenec 5g/litr	5.24
WO	révové výlisky	kamenec 5g/litr	3.45

Diskuze:

a) Barvení a stálosti

Anthokyaniny z révových výlisků obarvily všechny tři druhy tkanin, rostoucí koncentrace výlisků v barvicí lázni se dobře odrazila i v sytosti výsledného vybarvení tkanin. Nejsytěji se obarvila vlněná a polyamidová tkanina, bavlna se podle očekávání barvila hůře. Domnívám se, že v případě anthokyanů se v interakcích s vlákny uplatňují kromě vodíkových můstků (a dle některých studií týkajících se interakcí flavonoidních polyfenolů s bílkovinami i možné hydrofobní interakce mezi některými aminokyselinami a benzenpyranovým kruhem¹²⁴) i iontové interakce a že zde především u vlny hraje roli izoelektrický bod (při pH kolem 4.7).

Přirozené pH extraktu z révových výlisků bylo 3.7 (pH vína je kolem 3.6), pH roztoku kamence o koncentraci 5 g/litr bylo 3.85, tedy barvení výlisky s mořením i bez něj probíhalo v oblasti kyselejší, než je izoelektrický bod vlny, tedy v oblasti, kdy se vlna již nachází v částečně protonizovaném stavu, zatímco anthokyaniny dosahují maxima barevnosti ve stavu flavyliového kationtu při pH ještě kyseleším. Odpudivé iontové síly mezi vláknem a barvivem tedy při pH kolem 3.6 ještě nemusí být tak silné a vlna bez moření i úprav pH lázně se barví na pěkné syté odstíny s relativně vysokými stálostmi. Jdeme-li však s pH barvicí lázně ještě níž, a to na hodnotu pH 2.5, barvíme už silně protonizovanou vlnu v podstatě kationickým barvivem. Díky dalším vazebným interakcím mezi vlnou a anthokyanem (nejspíše vodíkové vazby) dosáhneme i při těchto hodnotách relativně dobrého vybarvení – navíc s pěkným projasněním odstínu (obr.66), ovšem toto slabší spojení barviva s vláknem se záhy projeví v horších stálostech, a to i při použití mořidlové soli.

Z hodnot v tab.18 až 20 je patrné, že vlivem UV záření došlo k největším změnám u tkanin předmořených taninem, a to již po 1-2 hodinách osvětlení. Zde došlo nejen k výraznému vyblednutí, ale i k největším změnám v barevném odstínu, tkanina barvená při pH 4.6 přešla vlivem UV záření z šedého do nazelenalého odstínu. Ostatní vzorky vykazovaly spíše vyblednutí než posun v odstínu, proto lze předpokládat, že tanin a patrně i jeho degradační produkty vzniklé působením UV záření způsobily chemické změny barviva.

Problematická interakce taninů s anthokyaniny se projevila již při samotném barvení, protože dosažený odstín byl u tkanin mořených taninem slabší než u tkanin nemořených, což je v rozporu s výsledky barvení anthokyaniny uváděnými v literatuře.³⁵

Tkaniny obarvené anthokyaniny z modré révy vykazovaly dle sytosti vybarvení světlostálosti stupně 3 (střední odstíny) až 4 (nejsytější odstíny na vlně), na bavlně pouze stupeň 2, nejlepší stálost v praní vykazovala obarvená polyamidová tkanina (st.4-5), o něco horší stálost měla obarvená vlněná tkanina a nejhůřší stálost měla opět obarvená bavlněná tkanina (st.1-2).

Nejvyšší světlostálost měly vzorky předmořené kamencem, ale i zde se nejnižší stálost projevila u vzorků barvených v nejkyselějším pH. Vzorky mořené kamencem obarvené anthokyaniny v neupraveném a mírně zalkalizovaném pH vykazovaly nejlepší světlostálosti odpovídající stupni 3-4 modré stupnice světlostálosti, což je již přijatelná hodnota pro nenáročnou použití u oděvních textilií.

Nejlepší světlostálost i stálost v praní měly vzorky vlny barvené buď v přirozeném pH barvicí lázně anebo mírně alkalizované, ovšem zde se již barevný odstín anthokyanů posouval do fialové až šedé. Použití kamence k předmoření vlny se projevilo značně sytými odstíny hnědé (v kyselém pH temně růžové).

Překvapením bylo velmi špatné vybarvení i stálosti (a při mírné alkalizaci lázně přímo nehezké zešednutí barvy) a posuny barevných odstínů i při krátkém ozáření UV lampou v případě použití taninu (kyseliny tříslové) k předmoření vlněné tkaniny. To je zcela

v rozporu s výsledky studie³⁵, kde autoři také při barvení textilií réвовými výlisky prováděli moření taninem nebo kamencem a docházeli ke značně lepším stálostem i vybarvení. Vysvětlit tento rozpor neumím, mohu jen konstatovat, že použití taninu k předmoření vlny barvené anthokyany z révy se mi nepotvrdilo jako vhodný postup pro barvení vlny ani pro její stálosti.

Vzorky mořené kamencem o koncentraci 3 g/litr byly mnohem sytější a jejich světlostálost vyhovovala vizuálně stupni 3 modré stupnice stálosti, což lze hodnotit jako již přijatelnou stálost pro levné oděvní textilie.

b) Zdravotní nezávadnost

Pokud jde o zdravotní nezávadnost obarvených tkanin, i zde vidím určité problémy. Vyšší hodnoty vyluhovatelné mědi (tab.24) souvisely u tkanin barvených réвовými výlisky s vyššími hodnotami mědi v samotných výliscích – lze předpokládat, že jejich zdrojem jsou postřiky, kterými vinaři chrání révu před škůdci (především plísní). Naštěstí v tomto bodě je i pro dětské výrobky norma dosti mírná (povoleno limit ve výluzích je 25 mg Cu/kg tkaniny) a měřené hodnoty výluhů tento povolený limit nepřekročily.

Jak ukazuje tab.24, ukázalo se, že i samotné tkaniny použité k barvení obsahovaly určité množství mědi, která se v kyselém potu vyluhovala mnohem lépe než v alkalickém (pozn.: je známo, že ionty kovů se stávají v kyselém prostředí lépe rozpustnými – to je např. i problém kyselých dešťů, které již jednou usazené a „neaktivní“ těžké kovy v životním prostředí opět v kyselé vodě „aktivují“, rozpustí a uvedou znovu do oběhu), nicméně např. kyselý výluh z obarvené bavlny tento obsah mědi zdvojnásobil až na hodnotu 13.86 mg/kg bavlny.

Zajímavé je, že i přes vysoký obsah mědi a zinku v extraktech z réвовých výlisků (tab.24), jejichž zdrojem jsou postřiky k ošetření révy před škůdci, povrchová prvková EDS analýza obarvených tkanin zaznamenala pouze nepatrná množství mědi a zinku (setiny hmotnostních procent), maximálně 0.15 hm.% Cu a 0.11 hm.% Zn u vzorku vlny předmořené kamencem o koncentraci 15 g/litr).

Příčinou přirovnosti hliníku ve výluzích a na povrchu tkanin je moření kamencem (síran draselno-hlinitý), jeho vyšší obsah v povrchové vrstvě vláken (0.22 hm.% na vlně, 0.28 hm.% na polyamidu a 0.78 hm.% na bavlně) se však objevuje až při moření s použitím vysoké koncentrace kamence (15 g/litr).

Navíc již několikrát zmíněný předpis Ministerstva zdravotnictví o hygienických požadavcích na hračky a výrobky pro děti ve věku do 3 let (vyhláška 84/2001 Sb.) obsahuje v příloze č. 10 ustanovení 2, podle kterého hodnota pH výluhu získaného třepáním 2 g textilie nebo netkané textilie ve 100 ml destilované vody po dobu 2 hodin při teplotě (20 ± 2) °C nesmí překročit limit 4.0 – 7.5, takže dodatečné okyselení tkaniny (pro zachování odstínu při barvení v kyselém pH) zvláště pro dětskou kůži vhodné není.

Jak je patrné z tab.26, předepsanou hodnotu pH překračuje už samotný vodný extrakt z výlisků a roztok mořidlové soli, takže není překvapením, že i vodný výluh obarvené vlny, která má již sama o sobě kyselý charakter, předepsaný limit nesplňuje, zatímco „zásaditá“ bavlna a polyamid částečně barvicí i mořidlovou lázeň neutralizují.

Závěr:

Výsledky barvicích a stálostních zkoušek s anthokyaniny, které byly provedeny, nejsou nijak převratné a vcelku odpovídají původnímu předpokladu: tkaniny se (až na silně kyselém pH) nebarví brilantními odstíny, spíše kalnějšími, anthokyaniny měnily odstín podle pH (tato nestabilita odstínu pochopitelně přetrvává i po obarvení tkaniny, takže chceme-li zachovat odstín dosažený na tkanině, je nutno také tkaninu následně prát v přiměřeném pH prací lázni, jinak se např. původně „kyselejší“ do červena posunutý odstín změní vypráním v alkalické lázni na šedofialový!), bavlna vzdoruje barvení, přičemž větší sytosti vybarvení na bavlně lze dosáhnout jen s použitím vysoké koncentrace mořidlové soli (signifikantního rozdílu v barvení bavlny bylo dosaženo až při použití kamence v koncentraci 15 g/litr!, obr.69), stálobarevnost na světle je poměrně dobrá jen u vzorků obarvených na sytější odstíny, což je případ vlny a polyamidu při barvení „silným“ extraktem nebo při použití kamence jako mořidla, stálost v praní byla nejlepší u obarvené polyamidové tkaniny.

Při barvení textilií pomocí anthokyanů z révy tedy vyvstává řada problémů: bez mořidlové soli se zde prakticky neobejdeme (a v případě bavlny musí být použita ve velmi vysoké koncentraci, aby se vůbec hlinitý iont do vlákna dostal a abychom na ní dosáhli sytějšího vybarvení). Výsledný odstín nakonec mění barvu podle pH prací lázně (i když s použitím mořidla tento proces již není tak dramatický), přičemž návrat částečně rozloženého barviva třeba omylém vypraného v běžné alkalické prací lázni již prostým následným okyselením tak snadno a kvantitativně do původního stavu nevrátíme.

Barvení oděvních textilií révovými výlisky hodnotím jako velmi problematické a sporné. Kromě kovů z moření se do barvené textilie dostává i měď a zinek, jejichž zdrojem jsou postřiky chránící révu před škůdci. Je tedy nutné zvažovat, pro jaké aplikace takové oděvy vlastně použít. Přestože limity pro obsah kovů byly dodrženy, nepřipadá mi barvení výlisky z révy vhodné pro dětské oblečení a o přívlastku „bio“ mám v případě barvení výlisky pochybnosti.

^f Křížová, H., Wiener, J., Grégr, J.: Barevné změny anthokyanů. Zpravodaj spolku textilních chemiků a koloristů. 43. konference TEXCHEM (2011), Pardubice, ČR. ISSN 1214-8091

^g Křížová, H., Wiener, J.: The possibility of textile dyeing with anthocyanins. Sborník konference. 18. mezinár. konference Strutex, TUL, Liberec (2011), ISBN: 978-80-7372-789-4

^h Křížová, H., Wiener, J.: Využití výlisků z modré révy v textilním průmyslu. Sborník konference. 8. sympozium Odpadové fórum, Kouty nad Desnou, Czech Rep. (2013), ISBN: 978-80-85990-22-5

ⁱ Křížová, H.: Testování světlostálosti textilií barvených přírodními barvivy ze zemědělských odpadů. Sborník konference. 9. sympozium Odpadové fórum, Hustopeče, ČR (2014), ISBN: 978-80-210-6832-2

^j Křížová, H.: Testování světlostálosti vlněné tkaniny barvené anthokyaniny z výlisků z modré révy. WASTE FORUM, Vol. 2 (2014), ISSN: 1804-0195, s. 88-94

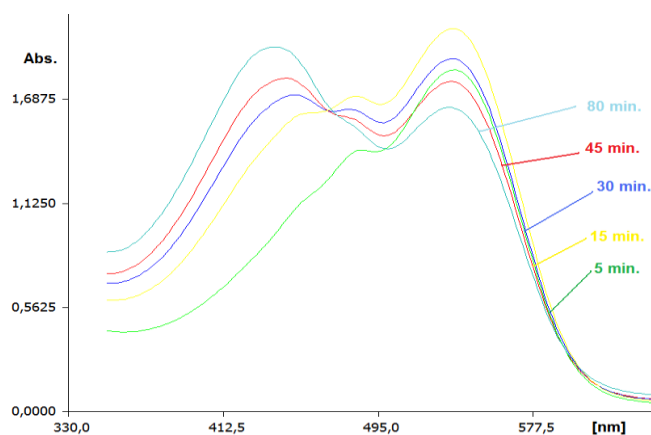
9.4 Experimenty s červenou řepou^k

Extrakce betalainů, barvení i předmoření tkanin probíhalo láznovým způsobem v barvicím přístroji Ahiba Nuance Eco (Datacolor). Pro úpravu pH barvicích lázní byla použita kyselina octová a uhličitán sodný, k předmoření tkanin byl použit kamenec v koncentraci 3 g/litr. Barvena byla vlněná tkanina (153 g/m²), polyamidová tkanina (polyamid 6.6, 78 g/m²) a směšová tkanina (80% vlna, 20% polyamid, 404 g/m²).

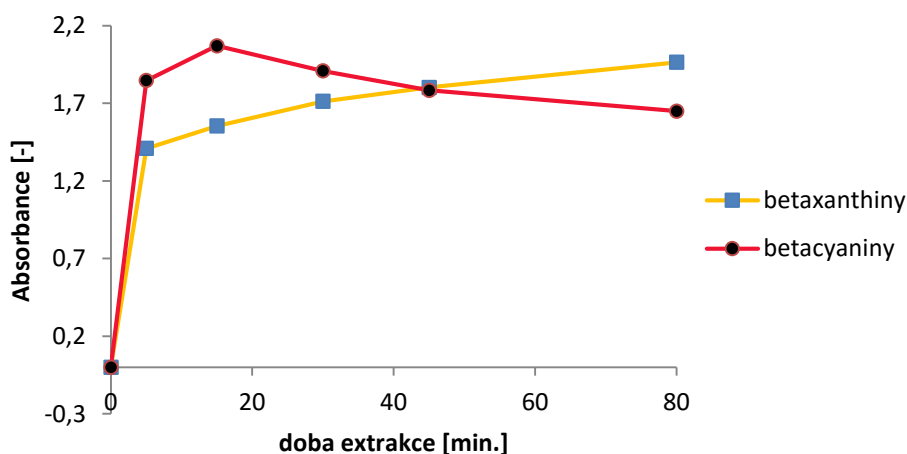
9.4.1 Extrakce betalainů

Extrakce řepných barviv probíhala při 80 °C v nerezové patroně aparátu Ahiba, kam bylo dávkováno 1.5 g usušeného řepné drti do 200 ml destilované vody. V intervalu 5 – 15 – 30 – 45 a 80 minut byly odebírány vzorky, které byly následně proměřeny na spektrofotometru (obr.70) a zaznamenány absorbance obou absorpčních maxim, jejich změny znázorňuje graf na obr.71. Extrahovaná barviva byla také proměřena na spektrofotometru v různě kyselém prostředí (obr.72).

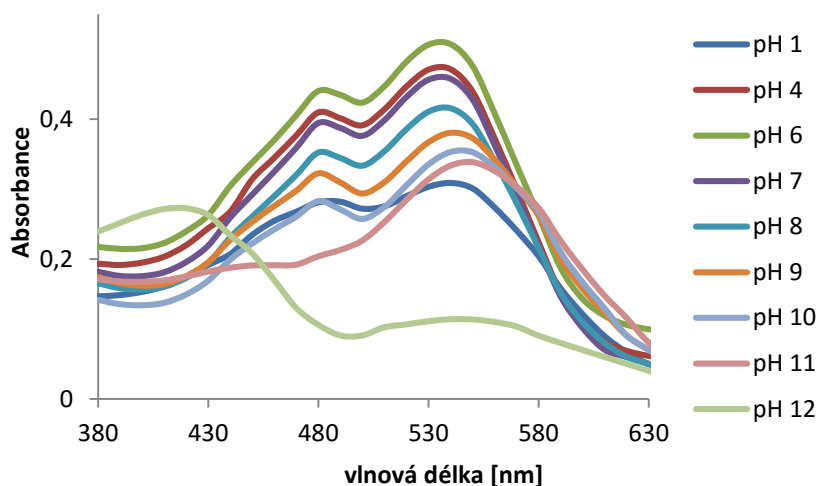
Výsledky:



Obr.70 VIS absorpční spektra betalainů odebíraných v různém čase extrakce



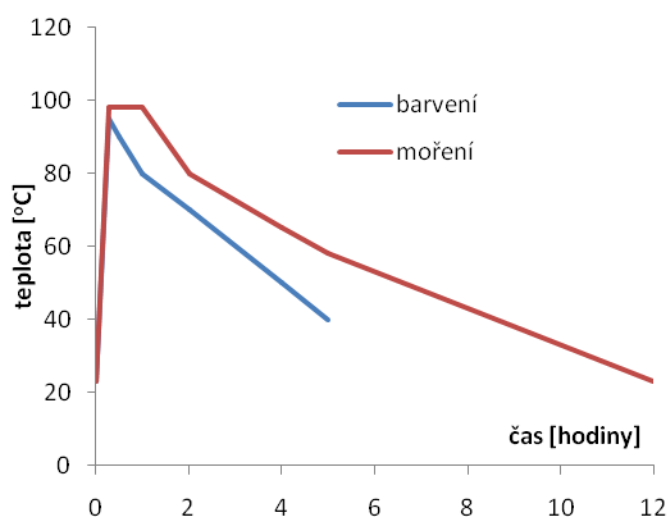
Obr.71 Změny absorbance v abs.maximech 476 a 534 nm v závislosti na době extrakce barviv z červené řepy



Obr.72 VIS absorpční spektra řepného extraktu v různém pH (stejně koncentrace)

9.4.2 Barvení červenou řepou a stálostí

Vlastní barvení testovaných tkanin předmořených kamencem probíhalo společně s extrakcí barviv (mořené tkaniny a sušená hrubě rozdrcená řepná hmota v jedné lázni), což jednak celý proces barvení textilií zkrátí, zjednoduší, zlevní a také je šetrnější k extrahovaným barvivům. Z obr.70 a 71 je totiž patrná značná termolabilita červeného řepného barviva. Časově-teplotní režim moření (modrá křivka) a následné extrakce barviv s barvením tkanin (červená křivka) byly provedeny podle schématu na obr.73. Složení barvicí lázně bylo optimalizováno poměrem 3:1:50 (3 g sušené řepné drti : 1 g textilie : 50 ml lázně).



Obr.73 Časově-teplotní režim moření a barvení tkanin červenou řepou

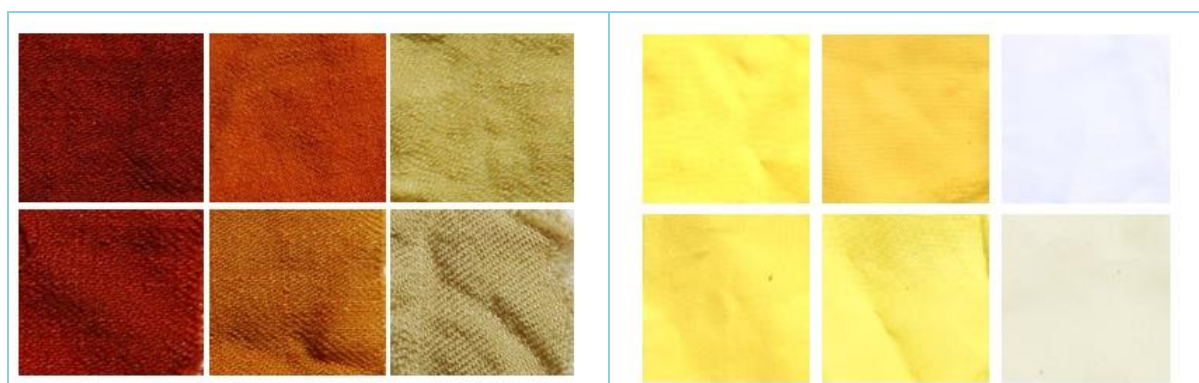
Výsledky:



Obr.74 Tkaniny obarvené červenou řepou (tkaniny mořené kamencem, 3 g/litr)

Tab.27 $L^*a^*b^*$ hodnoty tkanin z obr.74 (PA = polyamid, CO = bavlna, WO = vlna)

Tkanina	L*	a*	b*
PA	90.6	-6.6	35.4
CO	92.0	-1.9	18.9
WO	50.2	24.1	29.4



Obr.75 a 76 Tkaniny obarvené červenou řepou (nahore mořené, dole nemořené, zleva doprava: kyselé – neutrální- zásadité barvení.

Vlevo: vlněná tkanina

Vpravo: polyamidová tkanina



Obr.77 Mořená vlněná tkanina obarvená řepou (vlevo 100% WO, vpravo směšová tkanina 80% WO, 20% PA)

Tab.28 Stálosti tkanin obarvených červenou řepou (předmořeno kamencem, 3 g/litr) v množství 60 g sušené řepné drti / litr barvicí lázně a s poměrem lázně 1:50

Materiál	Stálost v praní (stupeň šedé stupnice)	Stálost na světle (stupeň modré stupnice)
PA	3 - 4	1 - 2
CO	-	-
WO	3	1 - 2

9.4.3 Zdravotní nezávadnost

Tab.29 Obsah těžkých kovů v extraktu z červené řepy a ve vyluzích tkanin obarvených červenou řepou

Tkanina	Barvení	Moření [g/litr]	Ni [μg/kg]	Pb [μg/kg]	Cr [mg/kg]	Cu [mg/kg]	Co [μg/kg]	Al [mg/kg]	Cd [μg/kg]
dest.voda	-	-	<10	<0.01	<0.002	0.03	<10	<0.01	<2
extrakt	řepa ^{*)}	-	148.4	125.0	0.095	2.5	6.5	< 0.5	11.4
alkal.pot	- (blank)	-	2.1	0.12	0.017	0.01	0.54	0.024	0.036
PA	- (blank)	-	116.4	37.9	0.88	0.71	24.66	0.57	3.8
CO	- (blank)	-	137.9	73.2	0.85	0.94	25.51	0.59	2.6
WO	- (blank)	-	169.9	14.0	0.87	1.78	25.91	0,5	1.2
PA	řepa	3	124.4	6.8	0.88	1.35	23.02	2.15	1.4
WO	řepa	3	148.9	11.6	0.91	0.65	22.32	160.3	0.4
kys.pot	- (blank)	-	4.09	0.67	0.018	0.12	0.22	0.016	0.056
PA	- (blank)	-	205.9	66.7	0.93	5.57	10.57	1.05	4.5
CO	- (blank)	-	235.9	35.9	0.92	5.87	13.52	1.51	3.6
WO	- (blank)	-	491.9	16.8	0.82	6.35	17.07	<0.50	4.4
PA	řepa	3	254.4	44.8	0.91	6.63	11.97	2.39	4.2
WO	řepa	3	224.4	64.2	0.81	5.30	10.37	22.77	3.7

pozn. ^{*)} vztaženo na 1 kg sušené červené řepy

Diskuze:

a) *Extrakce*

Z absorpčních spekter řepného extraktu na obr.70 a 72 jsou patrna dvě maxima v absorpčním spektru červené řepy, první kolem 476 nm (odpovídá žlutým betaxanthinům) a druhý kolem 534 nm (odpovídá červeným betakyanům). Je zřejmé, že k zásadní změně ve tvaru těchto křivek dochází až v silně zásaditém prostředí (pH 10), kdy se začíná ztrácet pík pro žlutou složku barviva.

Z grafu na obr.70 vyplývá, že ideální doba extrakce červených betakyanů je už při 80 °C velmi krátká, a to prvních 10 – 20 minut od dosažení extrakční teploty. Pak sice dochází k dalšímu nárůstu žlutých betaxanthinů, ale zároveň k poklesu červených betakyanů, což se vizuálně projeví změnou barvy extraktu z jasně růžovočervené na červenooranžovou. Znamená to, že betakyaniny v červené řepě jsou značně citlivé na vyšší teplotu, proto byl extrakčně-barvicí proces optimalizován tak, aby bylo dosaženo extrakční a současně barvicí teploty kolem 95 °C během cca 20 minut a následně se již teplota jen snižovala v postupném chladnutí.

b) *Barvení*

Na obr.74 je vidět, že i mořená bavlna se řepným extraktem prakticky vůbec nebarví, zato se ukázal velmi zajímavý efekt rozdílného vybarvení vlny a polyamidu – na první pohled je vidět, že polyamid se barví převážně žlutými betaxanthiny a na vlně dominuje červený betanin.

Na obr.75 a 76 je přehled barvení vlny a polyamidu v různě kyselé barvicí lázni – je vidět výrazný rozdíl mezi vlnou, která se v kyselém a neutrálním prostředí barví v odstínech od oranžové do červenopurpurové a polyamidovou tkaninou, která se barví pouze odstíny žluté. Moření kamencem tyto barvy ještě zvýraznilo a zjasnilo a naprosto výjimečný odstín sytě červenopurpurové barvy byl dosažen na předmořené vlněné tkanině barvené v kyselém prostředí.

Příčiny rozdílné afinity betaxanthinů a betakyaninů k oběma typům vláken vycházejí patrně z jejich rozdílné chemické struktury: betaxanthiny mají polárnější molekuly než betakyaniny. Polárnější betaxanthiny jsou rozpustnější ve vodě, a tak se rovnováha mezi soustavou barvicí lázeň-vlákno posouvá u méně rozpustných a méně polárních betakyaninů ve prospěch vlákna. Navíc slabě kyselé prostředí kyseliny octové způsobí kromě protonizace aminoskupin vlny také potlačení disociace karboxylových skupin obou barviv, která jednak jejich rozdílnou rozpustnost ještě prohloubí a jednak lze říci, že zprotonovaná vlna má v kyselém prostředí kladnější náboj než obě barviva (iminoskupiny těchto barviv se protonizují až v silně kyselém pH), tedy zjednodušeně barvivo je „zápornější“ než vlněné vlákno, a tak jsou barviva k vlně do jisté míry přitahována také na základě elektrických nábojů (nebo spíše jsou méně odpuzována na základě různě silných kladných nábojů).

Hlavní příčinou odlišného vytažení obou barviv na obě vlákna však budou patrně difúzní jevy. Větší a méně ohebná molekula betakyaninů proniká do neporézního polyamidového vlákna mnohem hůře než menší a ohebnější molekula betaxanthinu, zatímco do porézního vlněného vlákna pronikají obě barviva. Navíc zde jistě hraje roli i značná chemická různorodost vlny oproti polyamidu, u nějž dochází k vazbám jen se sporadickými karboxylovými a aminoskupinami, které ukončují dlouhé úseky jeho alifatických řetězců.

Odlišnou afinitu barviv z červené řepy tak lze využít např. pro dosažení melírového efektu při barvení směsové tkaniny (WO/PA – obr.77 nebo PES/PA, kde se nabarví pouze polyamid žlutě bez obarvení polyesteru) nebo při barvení dvousložkové vzorované pleteniny.

c) Stálostí

Stálost v praní, která byla prováděna upraveným postupem na základě normy ČSN EN ISO 105-a01 (80 0120), byla u všech testovaných tkanin průměrná: stupeň 3 (vlněná tkanina) a stupeň 3-4 (polyamidová tkanina) šedé stupnice. U tkanin zároveň nedošlo k zapouštění na doprovodnou vlněnou ani polyamidovou tkaninu.

Jak už bylo zmíněno, zásadním problémem, se kterým se potýká použití řepných barviv i v potravinářství, je jejich nízká světlostálost. Ta se projevila také u obarvených tkanin, které podle modré stupnice dosáhly u žlutě nabarvených polyamidových tkanin pouze stupně 1, u tmavších odstínů červenopurpurové barvy na vlně max. stupně 2. To znamená, že k vyblednutí barev docházelo již po několika málo hodinách intenzivního UV osvětlení. Zjištěná nízká světlostálost řepných barviv na tkaninách sice odpovídá původnímu předpokladu, ale je v přímém rozporu s výsledky prezentovanými v pracích, které se zabývají barvením betalainy z opuncie.^{26, 72, 73}

d) Zdravotní nezávadnost

Obsah kovů zjištěný u řepného extraktu, simulovaného potu a výluhu z tkanin je uveden v tab.29. Všechny testované vzorky splnily limity obsahu kovů ve výluzech stanovené vyhláškou. Vysoké hodnoty hliníku u vzorků obarvených řepou souvisí s předmořením kamencem (síran draselný-hlinitý), limit pro vyluhovatelný hliník však v předpisu 84/2001 Sb. není uveden.

Závěr:

Zdá se, že odpad z červené řepy, který vzniká v potravinářském průmyslu ať už jako drcená hmota po extrakci řepné šťávy nebo v podobě slupek z řepy zpracované do salátů, může před recyklací posloužit jako zdroj barviv pro barvení vlny a polyamidu. Odlišná afinita obou v řepě přítomných barviv k těmto dvěma textilním materiálům je zajímavým aspektem tohoto barvení. Lze toho využít k melírování a dalším efektům při použití směsové tkaniny či pleteniny. Naprosto výjimečný odstín sytě červenopurpurové barvy byl dosažen na kamencem předmořené vlněné tkanině při barvení v okyselené lázni. Závažným problémem je však velmi malá světlostálost dosažených odstínů a také termolabilita extrahovaného červenopurpurového betacyanu betaninu.

Obsah kovů v použitém materiálu splnil zdravotní limity dané vyhláškou, ale protože jde o přírodní produkt, je tento obsah závislý na podmínkách pěstování, a proto i zde platí totéž, co již bylo řečeno u barvení dubovou kůrou: při průmyslovém použití by měl být samozřejmostí monitoring obsahu škodlivých látek v tomto materiálu.

^k Křížová, H.: *Dyeing of woollen and polyamide fabrics by beetroot waste from cannery*. WASTE FORUM, Vol. 2 (2015), ISSN: 1804-0195, s. 57-63

9.5 Experimenty s flavonoidními barvivy ze žlutých květů^{l, m}

K barvení vlněné tkaniny předmořené chloridem cínatým byly vybrány žluté květy těchto bylin a keřů: zlatice prostřední (*Forsythia intermedia*), janovec metlatý (*Cytisus scoparius*), azalka žlutá (*Rhododendron luteum*), zákula (kerie) japonská (*Kerria japonica* "Pleniflora"), řepka olejka (*Brassica napus*) a smetánka (pampeliška) lékařská (*Taraxacum officinale*), jejichž přehled je v tab.30. Většina těchto rostlin obsahuje flavonoidní barviva, ale v zákule, řepce a pampelišce jsou obsaženy i karotenoidy a xantofyly (např. lutein), což jsou kromě žlutých barviv také zhášeče volných radikálů.

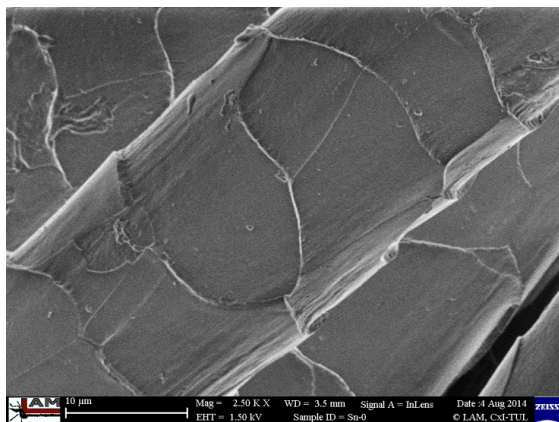
Tab.30 Přehled rostlin s obsahem žlutých barviv v květech použitých k barvení vlněné tkaniny

Číslo	Rostlina	Latinský název	Čeleď	Doba květu	Hmotnost květu
1	Zlatice prostřední	<i>Forsythia intermedia</i>	Oleaceae	IV - V	0.04
2	Janovec metlatý	<i>Cytisus scoparius</i>	Fabaceae	V - VI	0.1
3	Azalka žlutá	<i>Rhododendron luteum</i>	Ericaceae	V - VII	0.3
4	Zákula japonská	<i>Kerria japonica</i>	Rosaceae	IV - V	0.6
5	Řepka olejka	<i>Brassica napus</i>	Brassicaceae	IV - V	0.03
6	Pampeliška lékařská	<i>Taraxacum officinale</i>	Asteraceae	IV - X	0.8

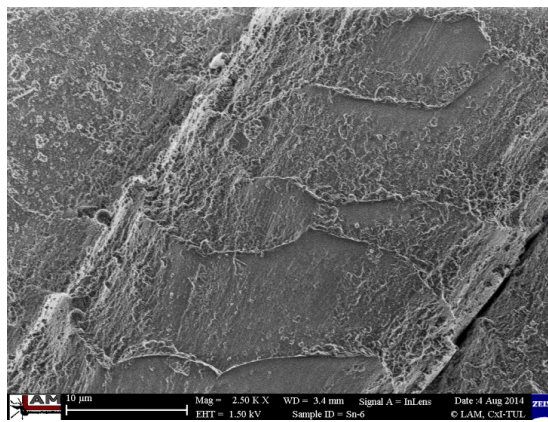
9.5.1 Moření vlněné tkaniny chloridem cínatým

Vlněná tkanina byla předmořena roztokem chloridu cínatého o koncentracích 0,5, 1, 2, 3 a 6 g/litr mořicí lázně. Moření probíhalo při poměru 1:50 (1 g textilie:50 ml lázně). Mořicí lázeň s textilií byla přivedena k varu a následně ponechána 12 hodin v chladnutí.

Výsledky:



Obr.78 Neupravená vlna (SEM, 2500x)



Obr.79 Vlna mořená SnCl₂ o koncentraci 6 g/litr (SEM, 2500x)

Tab.31 EDS analýza vlněné tkaniny mořené různými koncentracemi SnCl₂ s barvením i bez barvení

Koncentrace SnCl ₂ [g/litr]	C [atom. %]	N [atom. %]	O [atom. %]	S [atom. %]	Cl [atom. %]	Sn [atom. %]	Celkem [atom. %]
nemoř.vlna	50.73	21.68	24.76	2.63	0.00	0.00	100.00
0.5 barveno	48.15	15.33	28.41	2.12	0.00	6.00	100.00
2.0 barveno	48.39	13.93	28.19	2.14	0.00	7.34	100.00
3.0 barveno	49.09	12.30	28.95	1.93	0.04	7.69	100.00
6.0 barveno	48.13	12.40	29.34	1.85	0.03	8.24	100.00
6.0 nebarveno	44.32	16.08	25.15	2.11	1.64	10.71	100.00

9.5.2 Barvení mořené vlněné tkaniny žlutými květy, stálosti

Vyždímané předmořené tkaniny byly přeneseny do barvicí lázně tvořené destilovanou vodou a čerstvými květy. Barvení probíhalo při poměru 1:100:20 (1 g tkaniny:100 ml vody:20 g čerstvých květů). Barvicí lázeň byla přivedena k varu, ve kterém byla ponechána 15 minut, následně lázeň samovolně chladla a tkaniny z ní byly vyjmuty až po 24 hodinách. Obarvené tkaniny byly důkladně vyprány s použitím pracího prostředku bez enzymů, optického zjasnění, fosfátů i bez alkalizace a vysušeny při 50 °C

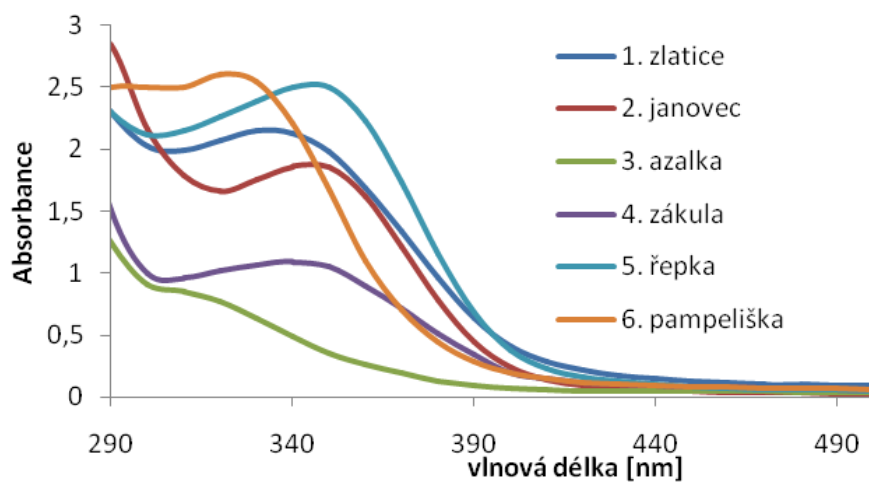
Výsledky:

Tab.32 L*a*b* hodnoty vlněné tkaniny obarvené květem zlatice při různé koncentraci předmořené cinatou solí

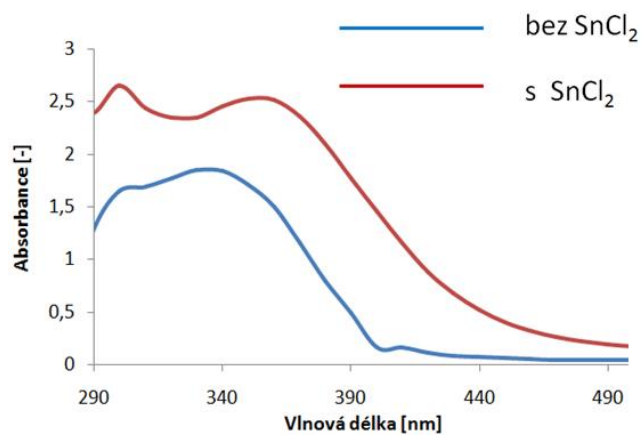
Koncentrace SnCl ₂ [g /litr]	L*	a*	b*
0.5	74.5	0.0	60.0
2.0	76.9	-0.5	58.1
3.0	69.0	-0.9	56.2
6.0	63.9	-2.4	52.0

Tab.33 L*a*b* hodnoty tkanin obarvených různými žlutými květy (koncentrace SnCl₂ 2 g/litr, množství květů 200 g/litr, poměr lázně 1:100)

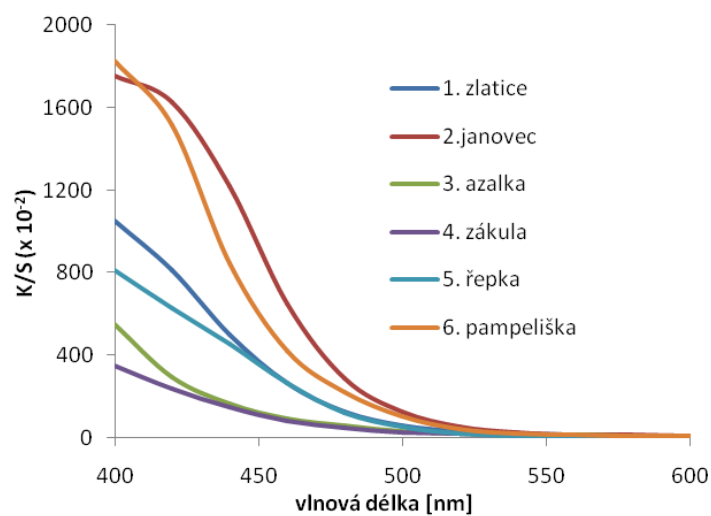
Rostlina č.	L*	a*	b*
1	76.9	-0.5	58.1
2	73.8	6.4	72.1
3	79.4	-0.3	39.1
4	80.2	-1.3	37.1
5	80.7	-0.1	63.0
6	76.4	3.6	69.2
neobarvená vlna	85.3	-1.6	18.4



Obr.80 UV/VIS absorpční spektra vodných extraktů ze žlutých květů



Obr.81 Hyper- a bathochromní posun UV/VIS spektra extraktu z květů zlatice po přidání chloridu cínatého



Obr.82 K/S funkce tkanin obarvených žlutými květy

Tab.34 Stálosti vlněných tkanin obarvených žlutými květy

Rostlina č.	Stálost v prání ^a	Světlostálost ^b
1	5	5 - 6
2	5	5
3	5	4
4	5	4
5	5	5 - 6
6	5	5 - 6

pozn. ^a stupně šedé stupnice, ^b stupně modré stupnice

9.5.3 UV protektivní vlastnosti tkanin obarvených žlutými květy

V tomto experimentu byla zjišťována schopnost barviv ze žlutých květů č.1-6 (viz tab.30) pohlcovat UV záření a likvidovat vzniklé volné radikály. V extraktech z květů byl zjišťován obsah celkových polyfenolů a průběh jejich UV/VIS absorpčních spekter, u obarvených tkanin byla proměřena remise, transmise UV-A záření, UPF ochranný faktor a také schopnost zhaset radikál DPPH i poté, co byla barviva natažena na namořené vlněné vlákno.

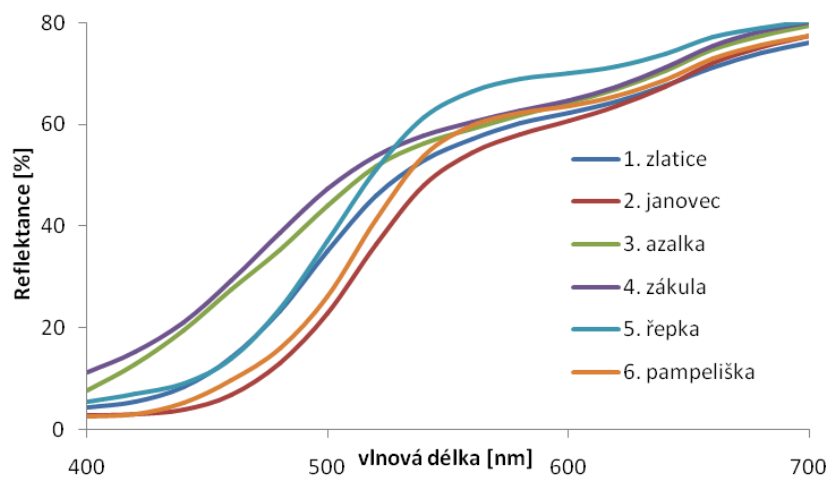
Vlněná kanina byla předmořena roztokem chloridu cínatého o koncentraci 2 g/litr. Moření probíhalo při poměru 1:50 (1 g textilie:50 ml lázně). Mořicí lázeň s textilií byla přivedena k varu a následně ponechána 2 hodiny v chladnutí.

Vyždímané předmořené tkaniny byly přeneseny do barvicí lázně tvořené destilovanou vodou a čerstvými květy. Barvení probíhalo při poměru 1:100:20 (1 g tkaniny:100 ml vody:20 g čerstvých květů). Barvicí lázeň byla přivedena k varu, ve kterém byla ponechána 15 minut, následně lázeň samovolně chladla a tkaniny z ní byly vyjmuty až po 12 hodinách. Obarvené tkaniny byly důkladně vyprány s použitím pracího prostředku bez enzymů, optického zjasnění, fosfátů i bez alkalizace a vysušeny při 50 °C.

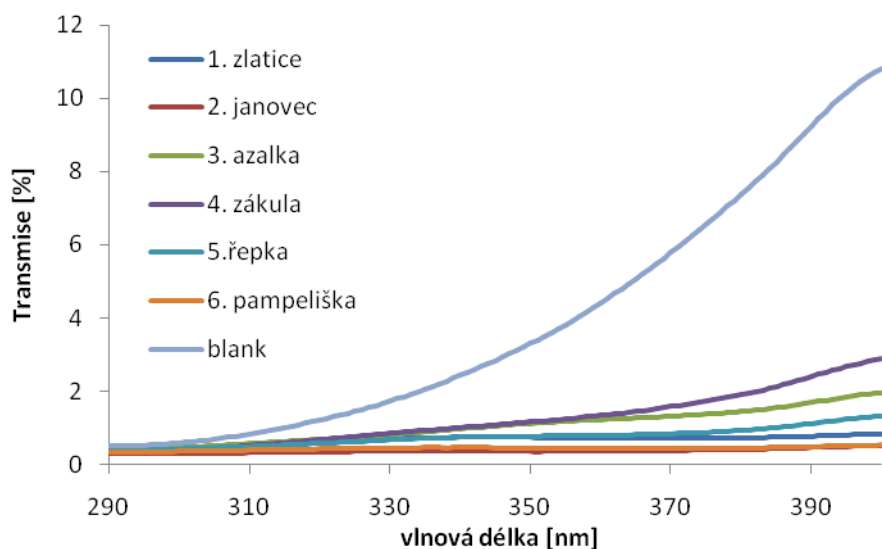
Výsledky:

Tab.35 Porovnání obsahu fenolů v květech a schopnost obarvené tkaniny zhaset volné radikály vyjádřená v barevném rozdílu na barevné ose b (systém CIE-Lab) po aplikaci 10 µL roztoku DPPH

Vzorek č.	1	2	3	4	5	6
Fenoly (A _{765 nm})	1.86	1.96	0.93	1.24	0.74	0.53
Δ b*	6.3	2.1	0.1	3.9	5.0	0.4



Obr.83 Remisní křivky vlny ošetřené cínatou solí (blank) a tkanin obarvených různými žlutými květy



Obr.84 Transmise záření o vln.délce 290 - 400 nm u nacinované vlny (blank) a u tkanin obarvených žlutými květy z tab.33

Tab.36 UPF hodnoty testovaných obarvených tkanin

Vzorek č.	vlna + SnCl ₂ (blank)	1	2	3	4	5	6
UPF	88.5	186.1	319.3	164.7	173.6	196.4	261.0

Diskuze:

a) Moření

Vlněná tkanina byla mořena různými koncentracemi chloridu cínatého (od 0.5 g do 6 g na litr). Ukázalo se, že vyšší koncentrace cínaté soli mají velmi destruktivní účinek na vlněnou tkaninu. Např. vlněná tkanina mořená cínem o koncentraci 3 g/litr se oproti tkanině mořené koncentrací 0.5 g/litr srazila v každém směru zhruba o 13%. Vyšší koncentrace cínaté soli (6 g/litr) kromě srážení vlny způsobila i výrazné změny omaku (drsnost) a drastické snížení pevnosti tkaniny. Obr.78 a 79 znázorňují snímky ze SEM neupravené vlny a vlny mořené koncentrací SnCl_2 6 g/litr po dobu 12 hodin.

U vzorků vlněných tkanin obarvených květem zlatice s předmořením chloridem cínatým o koncentracích 0, 0.5, 2, 3 a 6 g/litr a u neobarveného vzorku vlněné tkaniny, která byla pouze mořena nejvyšší koncentrací cínaté soli, byla provedena EDS prvková analýza povrchu vláken (tab.31). Je patrné, že následný barvicí proces snížil původní obsah cínu na nejvíce předmořené tkanině (z původních 10.71 na 8.24 atomových %) a také, že na rozdíl od pouze mořené tkaniny jsou po barvení zbytky chloru na vláknech již prakticky nulové. To vylučuje poškození vlny vznikem chloraminů. Nepříliš velké rozdíly v obsahu cínu na povrchu vláken (6 až 8.24 atomových %), která byla před barvením mořena koncentracemi SnCl_2 od 0.5 do 6 g/litr potvrzují, že přílišné zvyšování koncentrace mořidla není pro vazbu s barvivem z květů efektivní a že koncentrace cínaté soli 0.5 - 2 g/litr je dostatečná k saturaci vlněného vlákna cínem při poměru 1 g tkaniny: 50 ml vody. Také vzhledem k toxicitě cínu je žádoucí použití tohoto mořidla minimalizovat.

Nárůst obsahu kyslíku v obarvených předmořených vláknech souvisí jednak s množstvím navázaného organického barviva, ale vyšší obsah kyslíku byl zaznamenán i u neobarveného vlákna po moření cínem. To může souviset s poškozením vlněného vlákna nebo ztrátou epikutikuly vlivem cínaté soli, díky kterému se vlákno stane hydrofilnějším (na obr.79 je patrné, že upravené vlákno nabobtnalo a je silnější než neupravené vlákno na obr.78 ve stejném zvětšení) a vyšší atomové % kyslíku tedy souvisí i s vyšším obsahem vody vázané na vlákno.

Chlorid cínatý je silné redukční činidlo, které může na vlněném vlákne napadat i disulfidické můstky v jeho struktuře – to může být jednou z příčin ztráty pevnosti. Redukcí disulfidických můstků, aminoskupin a snad i iminů v peptidických vazbách keratinového vlákna mohou v kyselém prostředí vznikat plynný amoniak (NH_3) a sirovodík (H_2S), které při tepelné úpravě uniknou, což může vysvětlovat, proč u předmořené a obarvené vlny došlo k úbytku dusíku a síry.

b) Barvení

Tab.32 obsahuje přehled $L^*a^*b^*$ hodnot vlněné tkaniny obarvené extraktem z květů zlatice při různých koncentracích použitého mořidla. Pěkné jasně žluté zbarvení měla tkanina už při minimální koncentraci SnCl_2 0.5 g/litr, při koncentraci 2 g/litr se odstín prohloubil, ale při dalším růstu koncentrace se kromě výše uvedených změn tkaniny odstín zakalil a tkanina získala "špinavý" nádech. Optimální koncentrace pro předmoření vlněné tkaniny je tedy 0.5 - 2 g/litr cínaté soli při poměru lázně 1:50.

Tab.33 obsahuje přehled výsledků barvení (CIE-Lab hodnoty obarvených tkanin při použití mořidla o koncentraci 2 g/litr). Přehled v této tabulce ukazuje, že odstíny obarvených vlněných tkanin se lišily u vzorků barvených zlaticí, janovcem a pampeliškou (č. 1, 2 a 6) především v nižší hodnotě jasu L^* (odstíny těchto obarvených tkanin byly temnější a sytější)

a také velmi mírným posunem k červené barvě, nicméně všechny vzorky byly obarveny na pěkné a čisté odstíny žluté barvy. Všechny obarvené tkaniny vykazovaly výbornou stálost v praní (stupeň 5) a velmi vysoké světlostálosti – tkaniny obarvené zlaticí, řepkou a pampeliškou dokonce stupeň 5 – 6 modré stupnice!

Na obr.81 je dobře vidět, že chlorid cínatý působí v reakci s rostlinným extraktem okamžitou výraznou změnu jeho spektra (přidáno několik kapek cínaté soli přímo do květy s extraktem ze zlatice). Po přidání SnCl_2 došlo k hyper- i bathochromnímu posunu spektrální absorpční křivky extraktu, což se projevilo sytější a temnějším odstínem žluté až oranžové barvy.

c) Absorpce UV záření

Jak bylo popsáno v teoretické části, předpokládá se, že flavonoidy (ale i karotenoidy nebo anthokyaniny) plní v rostlinách roli jednak záchytu pro tkáň rostliny nebezpečného UV záření (uvědomme si, že většin těchto žlutých květů se objevuje na jaře, kdy je sluneční svit v naší zeměpisné šířce nejprudší – Země prochází 4. ledna přísluním, perihéliem, a intenzita slunečního záření je v době konce zimy a počátku jara v severních šířkách nejvyšší) a jednak antioxidantů a lapačů vznikajících radikálů

Absorpční spektra extraktů z květů (obr.80) vykazují podobný průběh absorpčních křivek, jejichž maxima se pohybují kolem 330-340 nm, což je oblast blízkého UV záření. Porovnejme tato absorpční maxima barviv v roztoku s obarvenými tkaninami: remisní křivky v oblasti viditelného světla znázorněné na obr.83 ukazují, že hodnoty remise (reflektance) záření u obarvených tkanin jsou v oblasti 400-450 nm velmi nízké a dochází zde tedy k silné absorpci záření obarvenou tkaninou. Spojením barevných extraktů z květů s vlněnou tkaninou a s cínatou solí dochází ke vzniku komplexů, jejichž důsledkem je zvýšení barevnosti a bathochromní posun (směrem k delším vlnovým délkám). Takže zatímco samotné extrakty z květů absorbují nejvíce vlnové délky do cca 380 nm, obarvené mořené tkaniny posouvají tuto absorpci až do přibližně 450 nm.

Na obr.82 jsou vyneseny průběhy Kubelka-Munkovy funkce (K/S hodnoty) v závislosti na vlnové délce. U všech vzorků je patrné, že K/S je maximální v oblasti blízkého UV záření a s rostoucí vlnovou délkou klesá, což znamená, že přítomnost barviva ve hmotě vlákna vede k silné absorpci UV záření, směrem k delším vlnovým délkám převažuje rozptyl světla.

Podobně také transmisivita blízkého UV-A záření o vlnové délce 290-400 nm obarvenými tkaninami měla ve srovnání s neobarvenou vlněnou tkaninou velmi nízké hodnoty (obr.84) a s tím souvisí vysoké hodnoty UPF (tab.36), které především u tkanin obarvených květem janovce a pampelišky vysoce překračovaly hodnoty definované jako „výborná UV ochrana“. Vzhledem k použité vlněné tkanině s vysokou dostavou, která sama o sobě měla UPF 50+ (88.5), vykazovaly pochopitelně všechny testované vzorky výbornou ochranu před UV zářením, ale průběh K/S funkcí obarvených tkanin na obr.82 ukazuje značné rozdíly mezi obarvenými tkaninami, které se následně promítly i do UPF hodnot (tab.36). Zatímco neobarvená tkanina začíná propouštět záření s vlnovou délkou už kolem 305 nm (obr.84), obarvené tkaniny začaly propouštět světlo až s vlnovou délkou kolem 330 nm. Samotné zbarvení způsobilo u testovaných vzorků hodnoty UPF od 164.7 (azalka) do 319.3 (janovec).

Nejvyšší UPF hodnoty ze všech testovaných vzorků byly naměřeny u tkaniny obarvené flavonoidními látkami z květů janovce (UPF 319.3), což byla např. ve srovnání s tkaninou obarvenou žlutou azalkou (UPF 164.7) téměř dvojnásobná hodnota. Také UPF hodnota tkaniny obarvené květem pampelišky, jejíž hlavní látkou zodpovědnou za žluté zbarvení je karotenoid epoxylutein a jejíž jasný sytý odstín žluté se velmi podobal odstínu tkaniny

obarvené janovcem, byla velmi vysoká (UPF 261). Zároveň si obě tyto tkaniny i po důkladném vyprání zachovaly vedle tkaniny barvené azalkou také nejlepší schopnost likvidovat volné radikály (viz dále).

d) Zhášení volných radikálů

Tab.35 obsahuje přehled obsahů fenolických skupin ve vodných extraktech ze stejných hmotností květů (označeno „**Fenoly (A765 nm)**“). Jde o absorbance extraktů při 736 nm po přidání Folinova činidla, tato hodnota je přímo úměrná celkovému obsahu fenolických skupin v květech.

Schopnost obarvených tkanin zhášet radikály byla testována změnou barvy textilie způsobené naneseným roztoku radikálu DPPH. V případě nereagující textilie nedošlo k odbarvení DPPH – skvrna zůstala fialová - Δb^* v Lab souřadnicích je vysoká kladná. V případě textilie zhášející radikály došlo k odbarvení DPPH – skvrna se odbarvila - Δb^* v Lab souřadnicích je nulová (tab.35).

Nejvyšší obsah fenolických skupin obsahovaly extrakty z janovce a zlatice, nejméně z květu pampelišky. Nízký obsah fenolických skupin v extraktu z květů pampelišky a přesto sytý a do oranžova posunutý odstín tkaniny nabarvené jejími květy potvrzují skutečnost, že i když jsou v pampelišce také přítomna flavonoidní barviva, za žlutou barvu v tomto květu je zodpovědný z větší části karotenoid epoxylutein.²⁶⁸ Nejsilněji byl radikál DPPH deaktivován ve tkanině obarvené květem azalky (vzorek 3), pampelišky a janovce (vzorky 6 a 2).

e) Další aspekty

K barvení vlněné tkaniny předmořené SnCl_2 v koncentraci 2 g/litr byly použity stejné hmotnosti čerstvých květů (200 g/litr). Všechny použité květy obarvily vlněnou předmořenou tkaninu na jasně žluté odstíny, z nichž nejsytější byly vzorky obarvené zlaticí, janovcem, řepkou a pampeliškou. Nicméně domnívám se, že janovec není ideální rostlinou pro barvení vlny, protože je mírně jedovatý (obsahuje několik lupanidinových alkaloidů a kardiotonických glykosidů²⁶⁹) a jeho květ bez květního kalichu má malou hmotnost (0.1 g).

Řepka olejka je v posledních letech díky Evropské unii a její kontroverzní podpoře alternativních energetických zdrojů pěstována na obrovských plochách evropské zemědělské půdy, na mnoha místech také zplahuje a lze ji považovat za široce dostupnou v relativně krátkém ročním období její vegetace, nicméně hmotnost jejího čerstvého květu bez kalichu je také velmi malá (přibližně 0.03 g).

Květ pampelišky měl jasný sytý odstín žluté, který se velmi podobal odstínu tkaniny obarvené janovcem a zlaticí. Navíc květ pampelišky má ze všech testovaných květů největší hmotnost (kolem 0.8 g) a k obarvení 10 g tkaniny v 1 litru vody postačuje cca 250 květů na rozdíl od janovce, kde je potřeba natrhat a ideálně též kvůli dosažení co nejčistšího žlutého odstínu bez příměsí chlorofylu očistit od zelených příměsí (stonky, květní lůžka a kalichy) cca 2000 květů, u zlatice je potřeba natrhat až 5000 květů a v případě řepky dokonce až 6 a půl tisíce květů!

Pampeliška je hojně rozšířená plevelná rostlina středoevropské přírody. Kromě toho, že je nenáročná na půdu a vyskytuje se od nížin do vysokých horských poloh, je také zároveň naprosto bezpečná, netoxická a na rozdíl od ostatních testovaných rostlin, které kvetou jen krátce na jaře, je její květ po většinu roku široce dostupný, protože kvete s malou letní pauzou prakticky nepřetržitě od jara do podzimu (tab.30).

Závěr:

Ukázalo se, že k předmoření vlněné tkaniny chloridem cínatým pro barvení žlutými květy s obsahem flavonoidů a karotenoidů z jarních žlutých květů bohatě postačuje minimální koncentrace 0.5 g SnCl₂/litr, maximálně však 2.0 g/litr. Vyšší koncentrace mořidla již nepříznivě ovlivňuje vlastnosti vlněné tkaniny i finální odstín.

Zdá se, že je možné dosáhnout pěkných žlutých odstínů s vysokými stálostmi na vlněné tkanině pomocí rozmanitých žlutých květů s obsahem flavonoidů nebo karotenoidů a xantofylů. Ze šesti testovaných rostlin (zlatice, janovec, azalka, kerie, řepka a pampeliška) je nejideálnějším kandidátem k tomuto použití květ pampelišky lékařské. Vzhledem k její široké dostupnosti, dlouhé době květu, netoxičnosti, velkému květu, pěknému žlutému odstínu, kterým barví cínem předmořenou vlněnou tkaninu a velmi vysoké stálosti v praní i světlostálosti, je květ pampelišky ve střední Evropě ideálním materiálem pro přírodní barvení vlny.

Také se ukázalo, že různé žluté květy keřů i bylin střeoevropské přírody, které obsahují flavonoidy a karotenoidy, mohou být s úspěchem použity i pro přípravu tkanin s vysokým UPF, s výbornou UV absorpční schopností a také schopností eliminovat škodlivé volné radikály. Nejlepší UPF hodnoty a zároveň výbornou schopnost likvidovat volné radikály v kontaktu s obarvenou tkaninou byly zjištěny u tkaniny obarvené květem janovce metlatého a pampelišky, ale vzhledem k obsahu lupanidových alkaloidů v janovci se domnívám, že je přeci jen ideálnější volbou i v tomto ohledu opět naše obyčejná, všude hojná a krásná pampeliška.

^l Křížová, H., Wiener, J.: *Dyeing of woollen fabrics pre-treated with tin chloride using yellow blossoms from Central European countryside. Autex Research Journal (recenzní řízení)*

^m Křížová, H., Wiener, J.: *Comparison of UV protective properties of woollen fabrics dyed with yellow natural dyes from different plant sources. Autex Research Journal (recenzní řízení)*

9.6 Testování antioxidačních vlastností polyfenolů

9.6.1 Cyklická voltametrie^{n, o}

Měřením byla ověřena platnost Randles-Ševčíkovy (4) (respektive Berzins-Delahayovy (5)) rovnice, podle kterých je hodnota proudového píku (zde 1. oxidační anodický pík kyseliny gallové) přímo úměrná 2. odmocnině skenovací rychlosti (obr.85 a obr.86).

Zapojení:

skelný uhlík (pracovní elektroda)
argentschloridová elektroda (referentní elektroda)
platinová elektroda (pomocná elektroda)

Hardware:

Potenciostat / Galvanostat Autolab 12/30/302 (Metrohm)

Software:

GPES (General Purpose Electrochemical System for Windows – version 4.9.007)

Analyt:

kyselina gallová (0.5 mM)

Elektrolyt:

syntetické víno (12% etanol v/v, kyselina vinná 0.033 M, pH 3.6 upraveno přidavkem 1M NaOH)

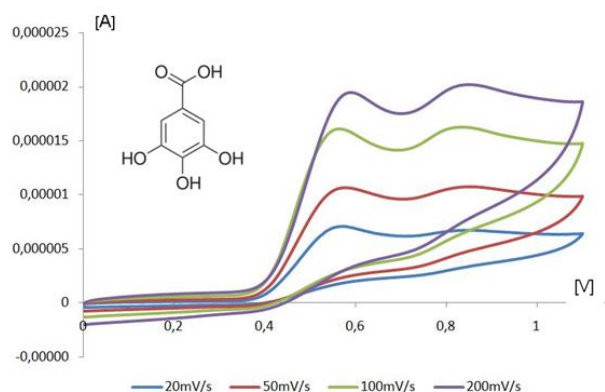
Skenovací rychlosti: 20, 50, 100 a 200 mV/s

Rozsah potenciálů: 0 – 1.2 – 0 V

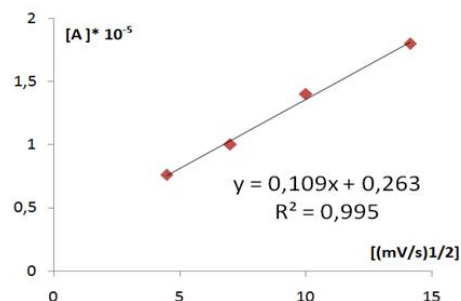
Cyklovoltamogramy červeného a bílého vína

Byly proměřovány cyklovoltamogramy červeného a bílého vína: červené víno *Côte de Nuits*, které pochází z Burgundska, departement Côte d'Or (Zlaté pobřeží), z vinic v okolí obce Nuits-Saint-Georges, ročník 2011 (ředění 10, 100, 200, 400 a 800x), bílé víno *Les Chais de Bacchus*, což je stolní víno z regionu Languedoc-Roussillon, departement Gard, z okolí města Nimes, ročník 2008 (ředění 10x a 40x).

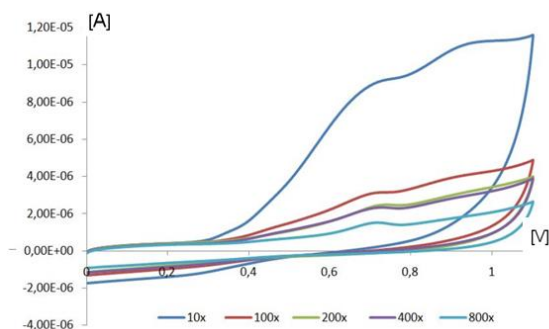
Výsledky:



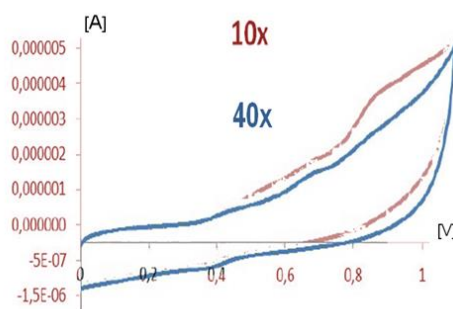
Obr.85 Cyklovoltamogramy 0.5 mM kyseliny gallové při různých skenovacích rychlostech



Obr.86 Lineární závislost pikového proudu na 2. odmocnině skenovací rychlosti



Obr.87 Cyklovoltamogramy červeného vína Côte de Nuits (2011), ředění 10x až 800x



Obr.88 Cyklovoltamogramy bílého vína Les Chais de Bacchus (2008), ředění 10 x a 40x

Diskuze:

Vzhledem k tomu, že se jedná o směs velkého množství polyfenolických látek, není na voltamogramu pochopitelně možné rozeznat jednotlivé komponenty. Píky různých elektrochemicky oxidovaných substancí se tak schovávají pod širokou vlnou, kde jsou 2 až 3 oxidační anodické píky pouze naznačeny, u červených vín především v oblasti kolem 0.7 V, což může odpovídat vysokému obsahu kondenzovaných taninů, které jsou obsaženy hlavně v révových jádérkách.

Oligomerní taniny a anthokyany jsou přítomny především ve slupce modrých hroznů, taniny s vyšším polymeračním stupněm jsou obsaženy hlavně v hroznových jádérkách a v třapínách. Rozdílný obsah polyfenolů v bílých a červených vínech je dán nejen jejich odlišným obsahem v bobulích, ale i odlišným způsobem jejich zpracování. Bílá vína se vyrábí kvašením vylisované šťávy, kdežto u červených vín se nechává lisovaná šťáva nějakou dobu macerovat a nakvášet společně s drcenými bobulemi. Během této doby do vína přecházejí barviva a třísloviny ze slupek, pecek a případně třapin. Červená vína jsou tedy z tohoto pohledu mnohem „zdravější“ než bílá, a to díky vysokému obsahu polyfenolů s antioxidačními, protizánětlivými i kardioprotektivními vlastnostmi (katechiny, resveratrol, kvercetin, anthokyany – glykosidy malvidinu, kyanidinu a další mono-, oligo- i polymerní flavonoidy), na druhou stranu jsou taniny hlavní příčinou trpké chuti červených vín.

Zrání červeného vína je proces, při kterém během několika měsíců až let dochází ve víně k mnoha změnám – nejkvalitněji zrají vína v dřevěných sudech (*barriques*), od nichž přejímají nejen typickou příchuť podle druhu dřeva, ale je zde zaručen i optimální přístup kyslíku.

Mikrooxidace je nutná k přeměně etanolu na acetaldehyd, který nastartuje kondenzační reakce anthokyanů. V průběhu zrání se obsah původních nízkomolekulárních anthokyanů postupně snižuje a vznikají oligomerní anthokyany a kondenzované taniny, které způsobí jednak změnu barevnosti vína (některé až k modrofialovým odstínům, jiné spíše k oranžovým), jednak změny chuti. Nerozpustné taniny se usazují na dně ve formě sraženiny a jsou odfiltrovány.²⁷⁰

Již na první pohled je zřejmé, že obsah polyfenolů v červených vínech je mnohem větší než v bílém víně, porovnáním voltamogramů a vzhledem k ředění vzorků lze konstatovat, že červená vína obsahují zhruba 5x více oxidovatelných substancí, především anthokyanů a taninů. Obsah polyfenolů v červených vínech se běžně pohybuje kolem 3 g/litr vína, v bílých vínech pod 0,5 g polyfenolů/litr vína.^{350, 271}

Porovnání cyklovoltamogramů a UV spekter kyseliny tříslové a vitamínu C vystavených oxidační zátěži ozónem

100 ml 0.5 M roztoků kyseliny tříslové a askorbové byly po dobu 20 minut probublávány ozónem v ozonizéru s průtokem 4 litry/min. a výkonem přibližně 3 mg O₃/litr vzduchu, průběžně byly odebrány vzorky pro elektrochemické měření a UV spektrofotometrickou analýzu.

Přístroje:

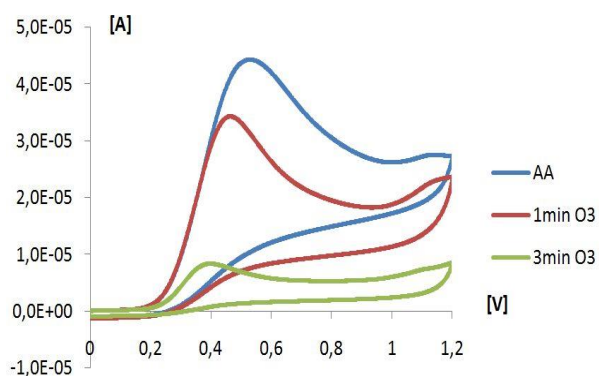
Generátor ozónu

Elektrochemická pracovní stanice CHI660C (Chenhua, Čína)

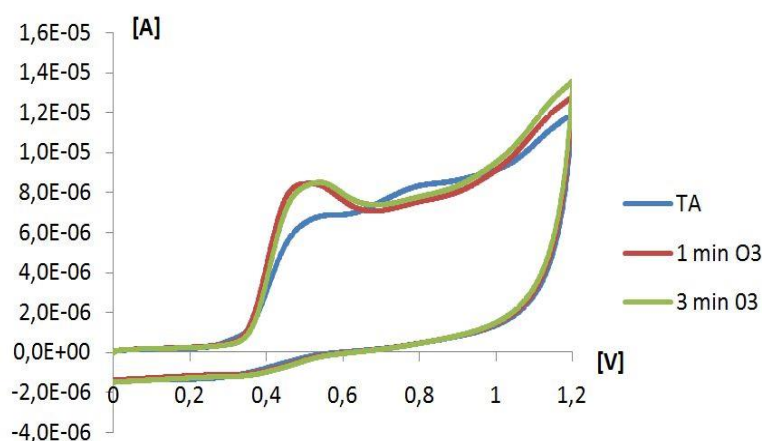
UV/VIS spektrofotometr UV-1600 PC (Mapada, Čína)

Cyklickou voltametrií byly proměřovány původní 0.5 mM roztoky a dále tytéž roztoky po 1 a 3 minutách ozonizace. Dále byla proměřena absorpční UV spektra roztoků 0.5 mM kyseliny askorbové a kyseliny tříslové, které byly vystaveny působení ozónu po dobu 0 až 20 minut.

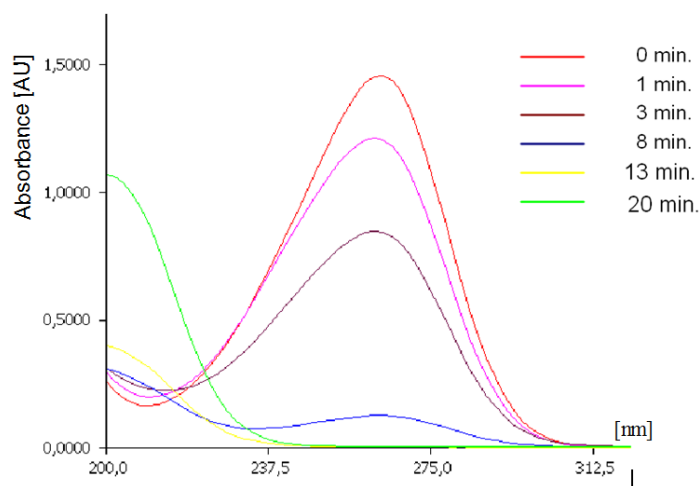
Výsledky:



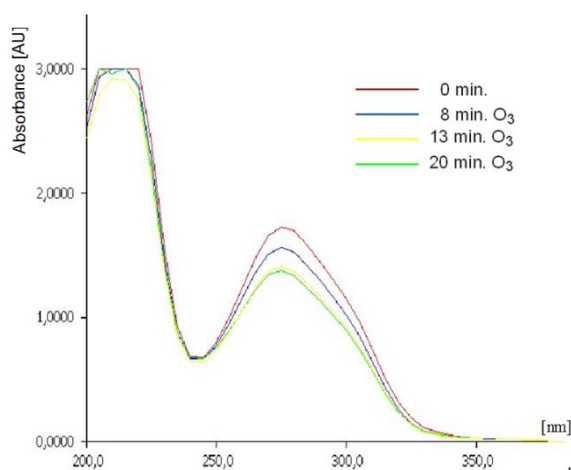
Obr.89 Cyklovoltamogramy 0.5 mM kyseliny askorbové vystavené působení ozónu (0, 1 a 3 min.)



Obr.90 Cyklovoltamogramy 0.5 mM kyseliny tříslové vystavené působení ozónu (0, 1 a 3 min.)



Obr.91 UV spektrum kyseliny askorbové po ozonizaci (0 až 20 minut)



Obr.92 UV spektrum kyseliny tříslové po ozonizaci (0 až 20 minut)

Diskuze:

Z voltamogramu i absorpčního UV spektra kyseliny askorbové (obr.89 a obr.91) vystavené silnému oxidačnímu účinku ozónu je zřejmý rychlý pokles obsahu této látky již v prvních 3 minutách, kdy dochází k oxidaci na kyselinu dehydroaskorbovou.

Polymerní kyselina tříslová sice vykazuje pomalejší pokles absorbanční vlny v UV spektru s maximem kolem 280 nm v průběhu 20 minut ozonizace (obr.92), nicméně na voltamogramu (obr.90) je zřejmé, že již v prvních 3 minutách dochází k výrazným změnám - druhý anodický oxidační pík v 0.8 V se ztrácí a dochází k nárůstu v oblasti prvního anodického píku při 0.5 V. To může být způsobeno rozkladem kyseliny tříslové na monomerní jednotky (kyseliny gallové), jejichž nárůst je na voltamogramu indikován nižším oxidačním potenciálem.

Závěr:

Cyklická voltametrie je velmi citlivá analytická metoda. Její výhodou je kromě vysoké citlivosti (zaznamenaná koncentrace analytu řádově 10^{-5} M/litr) i velmi malá spotřeba vzorku, je to metoda relativně levná a z jednoduše měřitelných veličin (el.proud, potenciál, náboj, čas) lze velmi rychle získat záznam obsahující celou řadu informací. To, že jsou primárně měřeny elektrické veličiny, také značně usnadňuje následný sběr a počítačové zpracování dat, protože již není třeba měřené signály na elektrické veličiny převádět.

Domnívám se, že cyklická voltametrie není metodou příliš robustní. Právě proto, že je velmi citlivá, je riziko vnesení chyby do měření značné, ať již jsou to chyby způsobené odchylkami v některé z elektrod nebo samotnou obsluhou přístroje.

Dalším problémem je neustálá nutnost čištění a leštění povrchu pracovní elektrody, na kterou se s každým skenem naadheruje vrstvička zoxidovaného polyfenolu a s každým dalším skenem je proudová odezva slabší. I přes stále stejnou metodiku čištění se velmi často stane, že týž analyt nedává stejnou proudovou odezvu při opakovaných skenech vlivem nedostatečně vyleštěného povrchu pracovní elektrody.

Cyklická voltametrie také není příliš specifickou metodou a třebaže hodnoty potenciálu, při kterých dochází ke vzniku redox píků, jsou kvalitativní charakteristikou, není pro kvalitativní analýzu příliš vhodná, protože podobnou odezvu může dávat mnoho látek. Také hodnoty měřeného elektrického proudu v sobě zahrnují řadu faktorů, (tzv. „agregátní“ charakter proudu), protože výsledný proud je souhrnem různých typů proudů (kapacitní, difúzní, elektrolytický). Je tedy vhodné kombinovat cyklickou voltametrii s dalšími nejlépe on-line metodami, např. s UV/VIS/IR spektroskopií, což v sobě ideálně spojuje obor **spektroelektrochemie**.

Cyklickou voltametrii v klasickém zapojení je vhodné považovat spíše za doplňkovou analytickou metodu, která přináší cenné informace o elektrodoových dějích, o pohybu elektronů a redox změnách konkrétního analytu. Cílem této práce bylo naznačit, jaké praktické informace lze získat klasickou cyklickou voltametrií v případě polyfenolů. Lze tak např. monitorovat průběh oxidace a zrání vín, porovnávat obsah antioxidantů ve vínech nebo rostlinných extraktech, zjišťovat antioxidační kapacitu přírodních antioxidantů, porovnávat jejich schopnost odolávat různé oxidační zátěži i zjišťovat následné chemické změny v systému.

ⁿ Křížová, H.: *Cyklická voltametrie aplikovaná na přírodní polyfenoly a antioxidanty. Sborník konference. 23. chemicko-technologická konference APROCHEM (2014), Hustopeče, ČR*

^o Křížová, H.: *Cyklická voltametrie polyfenolů. Bakalářská práce. Farmaceutická fakulta v H. Králové, Univerzita Karlova v Praze. (2014)*

9.6.2 Porovnání antioxidační aktivity (AOA) vybraných látek^P

Kyselina askorbová vs. kondenzované taniny

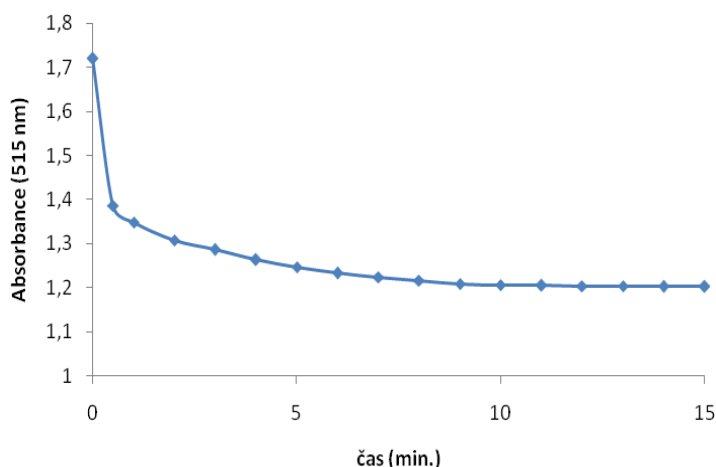
Byly připraveny roztoky kyseliny askorbové (vitamín C) a roztok kondenzovaných taninů - proanthokyanidinů (Tannin Grape – komerční taninový extrakt z révových výlisků), každý o koncentraci 0.2 g/litr. Dále byl připraven vodný extrakt z vysušených a namletých semen modré révy odrůdy Modrý Portugal, a to 20minutovým varem 0.5 g materiálu v 50 ml destilované vody a následně byl tento roztok smíchán se 100 ml syntetického vína, což je 0.033 molární roztok kyseliny vinné obsahující 12 objemových procent ethanolu, s pH upraveným pomocí NaOH na hodnotu 3.6.

Přibližně 15 mg stabilního radikálu DPPH (1,1- difenyl 2- pikrylhydrazyl) bylo rozpuštěno ve 200 ml ethanolu s použitím magnetického míchadla po dobu 2 hodin. Vznikl fialový roztok o absorbanci 1.7 absorpčních jednotek v absorpčním maximu 515 nm. Tento roztok byl dávkován po 2 ml do kyvet a do každé kyvety bylo přidáno 50 μ l vzorku měřeného roztoku. Obsah každé kyvety byl několikrát promíchán mikropipetou a po 15 minutách byly odečítány hodnoty absorbance. Antioxidačním mechanismem polyfenolů a dalších látek (např. vitamín C) je původně stabilní radikál DPPH destabilizován, což se projeví jeho odbarvováním (postupný přechod do žluté barvy) a tedy i různě velkým poklesem jeho absorbance v 515 nm.²⁵⁸ Kyselina askorbová způsobí tuto změnu velmi rychle během několika vteřin až na stabilní hodnotu absorbance, kondenzované taniny odbarvují roztok DPPH zvolna a k limitní hodnotě absorbance roztoku v kyvetě se začnou přibližovat po zhruba 15 minutách působení (obr.93), kdy byly všechny výsledky odečítány.

Vodné roztoky kyseliny askorbové a kondenzovaných taninů o stejné koncentraci byly vystaveny teplotám 80 a 100 °C po dobu 45 minut a byl porovnán pokles jejich schopnosti likvidovat volný radikál DPPH (tab.37 a 38)

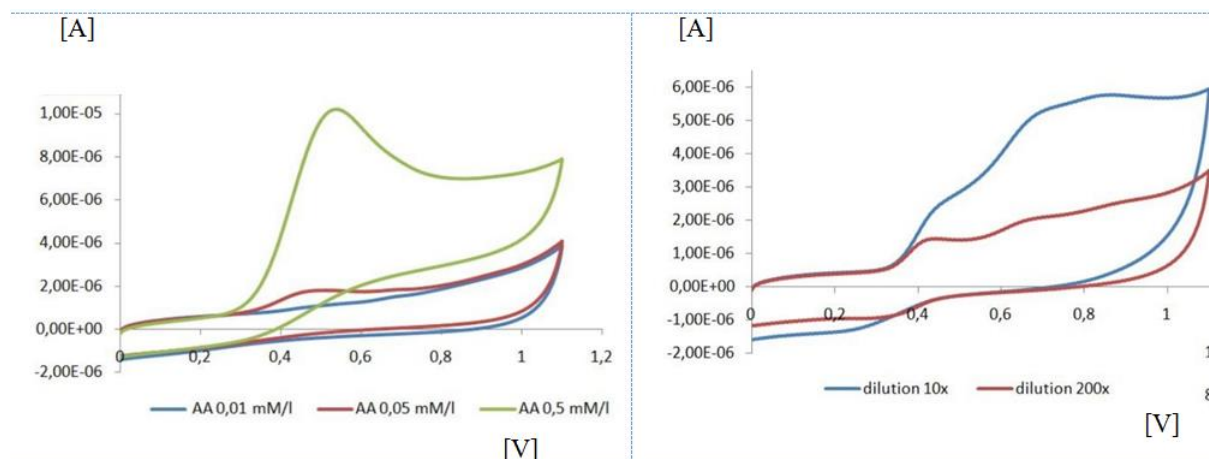
Extrakt z révových jader a roztok kyseliny askorbové byly proměřeny metodou cyklické voltametrie a zaznamenán průběh jejich elektrooxidace.

Výsledky:



Obr.93 Zhášení radikálu DPPH po přidání 50 μ l taninu o koncentraci 0.2 g/litr

Rozdíly v průběhu elektrooxidace kyseliny askorbové a kondenzovaných taninů jsou demonstrovány záznamem z cyklické voltametrie, kde je patrný u vitamínu C jediný výrazný anodický oxidační pík v hodnotě přibližně 0.5 V (obr.94) a zároveň 3 postupné anodické oxidační píky u extraktu z révových semen (obr.95), který měl velmi podobné složení jako kondenzované taniny z produktu Tannin Grape. Hodnoty oxidačních píků byly přibližně 0.4, 0.65 a 0.8 V při skenovací rychlosti 100 mV/s v prostředí syntetického vína.



Obr.94 Cyklický voltamogram kyseliny askorbové (3 po sobě jdoucí skeny)

Obr.95 Cyklický voltamogram kondenzovaných taninů

Tab.37 Změny antioxidační aktivity po 45 minutách při 80 °C

odbarvení DPPH	tanin	pokles AOA [%]	kyselina askorbová	pokles AOA [%]
$\Delta_1 A_{515} (t_0)$	0.723	-	0.425	-
$\Delta_2 A_{515} (t_{45})$	0.705	-	0.183	-
$\Delta = \Delta_1 - \Delta_2$	0.018	2.5	0.242	56.9

Tab.38 Změny antioxidační aktivity po 45 minutách při 100 °C

odbarvení DPPH	tanin	pokles AOA [%]	kyselina askorbová	pokles AOA [%]
$\Delta_1 A_{515} (t_0)$	0.731	-	0.660	-
$\Delta_2 A_{515} (t_{45})$	0.661	-	0.162	-
$\Delta = \Delta_1 - \Delta_2$	0.070	9.6	0.498	75.5

Závěr:

Tabulka 34 a 35 potvrzuje termolabilitu kyseliny askorbové, jejíž antioxidační aktivita poklesla za 45 minut při teplotě 80 °C na méně než polovinu původní aktivity a při teplotě 100 °C dokonce na čtvrtinu původní hodnoty, přičemž antioxidační aktivita taninů zůstala prakticky nezměněna (AOA roztoku kondenzovaných taninů poklesla o 2.5 % při 80 °C a o 10 % při 100 °C).

Kvantifikace antiradikálové aktivity

5 mg radikálu DPPH bylo rozpuštěno v 70 ml etanolu a 30 ml vody za vzniku fialového roztoku s absorbcí 1.0 v maximu 515 nm. Tento roztok byl dávkován po 5 ml do čtyř zkumavek.

Zároveň byly připraveny roztoky kyseliny gallové, kyseliny tříslové, kyseliny askorbové a komerční směsi kondenzovaných taninů Tannin Grape, každý roztok o koncentraci 0.1 g/litr.

Do zkumavek s 5 ml roztoku DPPH bylo dávkováno postupně po 50 μ l těchto roztoků, dokud se fialový roztok DPPH neodbarvil (nezežloutnul), tj. dokud neklesla absorbance A_{515} z 1 na přibližně 0.3, což odpovídalo stavu, kdy byl deaktivován všechny přítomný DPPH radikál. Ze spotřeby příslušného antioxidantu bylo vypočteno, v jakém poměru molekul jsou přibližně tyto látky schopny radikál DPPH deaktivovat. Výsledky jsou v tab.39.

Tab.39 Deaktivace radikálu DPPH antioxidanty – přehled objemů, hmotností a látkových množství

	M [g/mol]	V	m [μ g]	n [μ mol]	n _{AO} : n _{DPPH}
DPPH	394	5 ml	250	0.63	-
kyselina gallová	170	150 μ l	15	0.09	1:7
kyselina tříslová	1701	250 μ l	25	0.015	1:42
kyselina askorbová	176	150 μ l	15	0.11	1:5.7
kondenzované taniny	?	200 μ l	20	?	?

M ... molární hmotnost

V ... objem roztoku antioxidantu spotřebovaný k deaktivaci 5 ml DPPH o koncentraci 0.05 g/litr

m ... hmotnost antioxidantu spotřebovaného k deaktivaci 250 μ g DPPH

n ... počet mikromolů antioxidantu spotřebovaného k deaktivaci 0.63 μ mol DPPH

n_{AO} : n_{DPPH} ... deaktivační molární poměr antioxidantu k DPPH

Závěr:

Monomerní kyselina gallová a kyselina askorbová zhasly radikál DPPH v podobném poměru, 1:7 (kyselina gallová) a 1:6 (kyselina askorbová). Pokud jde o polymerní taniny, měření ukázalo, že 1 molekula kyseliny tříslové je schopna deaktivovat přibližně 42 molekul radikálu DPPH! Směs kondenzovaných taninů nespecifikovaného složení se chovala velmi podobně jako kyselina tříslová, k deaktivaci 250 μ g DPPH bylo potřeba kolem 20 μ g taninu.

Je zřejmé, že antioxidační síla taninů je přibližně 6x vyšší než u klasického antioxidantu kyseliny askorbové, ale na rozdíl od velmi rychlého účinku kyseliny askorbové taniny zhasají radikály velmi zvolna – po dlouhou dobu a se značnou kapacitou. Také je zřejmý výrazný rozdíl v tepelné stabilitě těchto látek: kyselina askorbová (vitamín C) byla více než z poloviny deaktivována již po 45 minutách při 80 °C, zatímco kondenzované taniny po 45 min. varu při 100 °C ztratily pouze 10% své aktivity.

P Křížová, H.: Porovnání antioxidačních vlastností kyseliny askorbové a kondenzovaných taninů. Sborník konference. DOKTORANDSKÝ WORKSHOP Světlanka (2013)

10. Závěr

Tato disertační práce se zabývá interakcí polyfenolů s textilními materiály se zaměřením na barvířské aplikace fenolických látek obsažených v odpadních materiálech z produkce vína, zpracování červené řepy a těžby dřeva. U jednotlivých materiálů je řešena optimalizace extrakce barviv a následné barvení vlny, polyamidu a bavlny ve vodní lázni a běžné stálosti. Vedle této ekologické tematiky se práce zabývá i flavonoidy obsaženými v květech divoce rostoucích rostlin. Práce tak pokrývá několik vybraných skupin fenolických přírodních barevných látek: flavonoidy, anthokyany a taniny, pro podobnost s anthokyany jsou přidány ještě betalainy obsažené v červené řepě. Na těchto modelech je demonstrována i problematika mořidel a vzájemných interakcí s přírodními a syntetickými vlákny. Modelově jsou řešeny také příklady kinetiky barvení a rozkladu barviv. Spojujícím prvkem všech uvedených aplikací je funkcionalizace textilních substrátů rostlinnými fenolickými látkami, které díky svým unikátním vlastnostem dávají vláknům nový rozměr a použití.

Pokud jde o přínosy této práce a nové poznatky, jsem si vědoma toho, že v oblasti přírodních barviv je po doslova staletích jejich používání a desetiletích jejich intenzivního výzkumu těžké přinést nové či dokonce šokující objevy v této oblasti. Jedním z přínosů je vypracování postupu barvení (nejen) vlněných vláken flavonoidy ve žlutých květech. Přesto, že přírodní barvení je záležitostí transkulturní a jeho tradice sahá do dávné minulosti, je v této práci na odborné úrovni popsána zcela originální receptura přírodního barvení žlutými flavonoidy, která není zmíněna v současné ani historické barvířské literatuře, a to barvení pomocí květů pampelišky, janovce, azalky či zlatého deště. Je však otázka, nakolik přínosné a udržitelné je barvení rostlinami, ať už divoce rostoucími nebo pěstovanými, v průmyslovém měřítku: i přes velmi dobré stálosti a bonus v podobě zvýšené ochrany takové textilie před UV zářením zůstává závažným problémem relativně nízký obsah barviv v rostlinách. To vede k nutnosti zpracovat velké množství materiálu, což celý proces logicky velmi prodraží.

Na druhé straně jsou tu ve velkém množství snadno a levně dostupné zemědělské, lesnické a potravinářské odpady s obsahem barevných rostlinných látek, které se k barvířskému využití přímo nabízejí. Např. barvení textilií betalainy je v naprosté většině dostupných studií věnováno betalainům z jiných rostlinných zdrojů, než je červená řepa – i zde je přínosem této práce určitá originalita ve využití dosud opomíjeného odpadního materiálu.

V rozporu s několika autory a studii, které se zabývají barvením anthokyany z révy, jsem po řadě experimentů s těmito látkami velmi skeptická, pokud jde o jejich využití pro barvení textilií. Pro dosažení sytých odstínů a alespoň trochu přijatelných stálostí se bez použití mořidlových solí neobejdeme a s nízkou životností takového vybarvení i změnou odstínu po každém vyprání je prostě nutno počítat.

I když nepatříme k zemím s příliš silnou tradicí přírodního barvení a přírodní barviva mají mnohé nevýhody z pohledu průmyslového zpracování, celosvětový nárůst výzkumu přírodních barviv předznamenává jejich renesanci. Je třeba akceptovat, že jejich použití je pro část spotřebitelů součástí životního stylu spojeného s ekologií a návratem k přírodě. Otázkou je, nakolik je v tomto stylu akceptovatelný kompromis s využitím anorganických mořidel, byť se jedná o látky, které jsou často používány dokonce i v potravinářském průmyslu (např. kamenec jako součást potravinářských kypřidel nebo chlorid cínatý dosud i u nás stále povolený jako aditivum v nápojích nebo zeleninových konzervách).

Velký a ne zcela využitý potenciál vidím v široce dostupných materiálech s vysokým obsahem taninů, a těmi jsou listy a především kůry stromů. Zde se kromě barevnosti textilií významně uplatňují i další vlastnosti katechinů a taninů – antioxidační a antibakteriální účinky spolu se schopností zhašet volné radikály. Jeden z přínosů této práce vidím v aplikaci

polyfenolů z kůry dubu na polyamidovou tkaninu, spolu se zhodnocením jejich částečně antibakteriálních vlastností a poukázáním na nutnost monitorování obsahu škodlivin ze životního prostředí vzhledem k přirozené schopnosti taninů tvořit komplexní sloučeniny s kovy a jak se zdá, patrně i se zvýšenou citlivostí k chromu.

Předchozí bakalářské a inženýrské studium na Fakultě textilní TUL ze mne vychovalo textilního barvíře a úpravníka, kterým se stále primárně cítím být, i přes následné biologické vzdělání na Farmaceutické fakultě UK. Během mého doktorského studia a také v této práci, jejímž leitmotivem jsou přírodní polyfenoly, jsem se snažila především poukázat na to, že textilní aplikace polyfenolů nabízejí veliký prostor pro základní výzkum, aplikovaný výzkum i publikační činnost a že by jim měla být i v budoucnu na textilní fakultě věnována pozornost.

V Janově u Nového Boru

5. 9. 2015

11. Seznam použité literatury

1. Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S.: Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* (2006), 99, s. 191–203
2. Matějková Š., Gut I.: Polyfenoly v potravě jako protektivní látky v aterosklerotickém procesu. *Remedia* (2000), 10(4), s. 192-201
3. Renaud S., de Lorgeril M.: Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* (1992), s. 1523-1526
4. Touriño S., Lizárraga D. et al.: Antioxidant/prooxidant effects of bioactive polyphenolics. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry* (2008), 7, s. 3348-3352
5. Akiyama, H. et al.: Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2001), 48, s.487-491
6. Haminiuk, C. W. I. et al.: Phenolic compounds in fruits – an overview. *International Journal of Food Science and Technology* (2012), 47, s. 2023–2044
7. Okubo, T. et al.: In vivo effects of tea polyphenol intake on human intestinal microflora and metabolism. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* (1992), 56, s. 588 – 591
8. Bruneton, J.: *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*. Intercept Ltd., Andover (1995), s. 275-279
9. Quideau, S. et al.: Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. A review. *Angewandte Chemie International Edition* (2011), 50(3), s. 586–621
10. Haslam, E.: *Practical Polyphenolics - From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action*. Cambridge University Press, Cambridge (1998)
11. Kotlíková, B. et al.: Prekurzory a vznik koloidního zákalu piva. *Chemické listy* (2013), 107, s. 362-368
12. Schofield, P., Mbugua, D. M., Pell, A. N.: Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology* (2001), 91, s. 21-40
13. Davídek J. et al.: *Chemie potravin. Skriptum VŠCHT, Praha* (1991)
14. Klejdus B., Kubáň V.: Rostlinné fenoly v allelopatii. *Chemické listy* (1999), 93, s. 243-248
15. Porter, L. J., Hrstich, L. N., Chan, B. G.: The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry* (1986), 25, s. 223-230
16. Oler, A., Neal, M. W., Mitchell, E. K.: Tannic acid: Acute hepatotoxicity following administration by feeding tube. *Food and Cosmetics Toxicology* (1976), 14(6), s. 565-569
17. Doat, J.: Les tannins dans les bois tropicaux (Tannin in tropical woods). *Revue bois et forets des tropiques* (1978), 182, s. 37-54
18. Barbehenn, R. V., Constabel, P. C.: Tannins in plant-herbivore interactions. *Phytochemistry* (2011), 72, s. 1551-1565
19. Fine, A. M.: Oligomeric proanthocyanidin complexes: history, structure, and phytopharmaceutical applications . *Alternative Medicine Review* (2000), 5, s. 144-151
20. Se-Kwon, K. et al.: Potential pharmacological applications of polyphenolic derivatives from marine brown algae. *Environmental Toxicology and Pharmacology* (2011), 32, s. 325-335
21. Ul Islam, S. et al.: Perspectives for natural product based agents derived from industrial plants in textile applications - a review. *Journal of Cleaner Production* (2013), s. 1-17
22. Kryštůfek, J. et al.: *Barvení textilií II. Skriptum TUL, Liberec* (2012)
23. Křížová, H.: Ověřování barvitelnosti extraktu z borytu barvířského. *Bakalářská práce. FT TUL, Liberec* (2009)
24. Mongkholrattanasit, R., Kryštůfek, J., Wiener, J.: Dyeing of wool and silk by eucalyptus leaves extract. *Journal of Natural Fibers* (2009), 6(4), s. 319-330
25. Cunningham, A. B. et al.: Hanging by a thread: natural metallic mordant processes in traditional Indonesian textiles. *Economic Botany*, (2011), 35, s. 241–266.
26. Guesmi, A. et al.: First application of chlorophyll-a as biomordant: sonicator dyeing of wool with betanin dye. *Journal of Cleaner Production* (2013), 39, s. 97-104
27. Tilley, R. J. D.: *Colour and the Optical Properties of Materials: An Exploration of the Relationship Between Light, the Optical Properties of Materials and Colour*. Wiley Online Library (2011)

28. Burkinshaw, S. M. et al.: A tannic acid/ferrous sulfate aftertreatment for dyed nylon 6,6. *Dyes and Pigments* (2008), 79, s. 48-53
29. Burkinshaw, S. M.: *Chemical principles of synthetic fibres dyeing*. Chapman and Hall, Glasgow, UK (1995), s. 92-96
30. Budeanu, R., Curteza, A., Radu, C. D.: Experimental researches regarding the ecological dyeing with natural extracts. *AUTEX Research Journal* (2014), 14(4), s. 290-298
31. <http://www.anachemia.com/msds/english/8598> [staženo 5.9.2015]
32. Vyhláška, kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin, předpis 4/2008 Sb. (příloha 2). on line: <http://www.zakonyprolidi.cz/cs/2008-4#p9> [staženo 5.9.2015]
33. Bhattacharya, S. D., Shah, A. K.: Metal ion effect on dyeing of wool fabric with catechin. *Coloration Technology* (2000), 116, s. 10-12
34. Karaboyaci, M., Uğur, S. S.: Ecological wool dyeing with pulps of lavender, broom, and red wine. *The Journal of The Textile Institute* (2014), 105(8), s. 821-827
35. Bechtold, T., Mahmud-Ali, A., Mussak, R.: Anthocyanin dyes extracted from grape pomace for the purpose of textile dyeing. *Journal of the Science of Food and Agriculture* (2007), 87, s. 2589-2595
36. Mahmud-Ali, A., Fitz-Binder, C., Bechtold, T.: Aluminium based dye lakes from plant extracts for textile coloration. *Dyes and Pigments* (2012), 94, s. 533-540
37. Bidlová, V.: *Barvení pomocí rostlin*. Grada Publishing, (2005)
38. Arroyo-Figueroa, G. Et al.: Cotton fabric dyeing with cochineal extract: influence of mordant concentration. *Coloration Technology* (2011), 127, s. 39-46
39. Erdem İşmal, Ö., Özdoğan, E., Yıldırım, L.: An alternative natural dye, almond shell waste: effects of plasma and mordants on dyeing properties. *Coloration Technology* (2013), 129, s. 431-437
40. Slanina, J., Táborská, E.: Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. *Chemické listy* (2004), 98(5), s. 239-245
41. Vodrážka, Z.: *Biochemie*. Academia Praha (1992)
42. Crozier, A., Jaganath, I., Clifort, M. N.: Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports* (2009), 26(8), s. 965-1096
43. López-Lazaro, M.: Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* (2009), 9(1), s. 31-59
44. Lin, Y. et al.: Luteolin, a flavonoid with potentials for cancer prevention and therapy. *Current Cancer Drug Targets* (2008), 6(7), s. 634-646
45. van Duijnhoven, F. J. et al: Fruit, vegetables, and colorectal cancer risk: the European prospective investigation into cancer and nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition* (2009), 89(5), s. 1441-1452
46. Velíšek, J.: *Chemie potravin*. Osis Tábor (2002)
47. Harborne, J. B., Grayer, R. J.: *The anthocyanins. The Flavonoids*. Chapman and Hall Ltd, London (1988)
48. Francis, F. J.: Food colorants: anthocyanins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (1989), 28(4), s. 273-314
49. Velíšek, J.: *Chemie potravin 3. 1.vyd. Tábor:Osis* (1999)
50. Schweppe, H.: *Handbuch der Naturfarbstoffe*. Ecomed Landsberg (1993)
51. Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., Paredes-López, O.: Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains – Characteristics, Biosynthesis, Processing and Stability, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, (2000), 40(3), s. 173-289
52. Drábek, J., Jalůvková, M., Frébort, I.: Kvantitativní PCR detekce nepovoleného přibarvení vína bezinkami. *Chemické Listy* (2007), 101, s. 550-555
53. Giusti, M. M., Wrolstad, R. E.: Characterisation and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, F1.2, (2001)
54. Křížová, H.: *Barevné změny anthokyanů*. Diplomová práce. FT TUL, Liberec (2011)
55. Bayer, E. et al.: Komplexbildung und Blütenfarben. *Angewandte Chemie* (1966), 78, s. 834-841
56. Shiono, M., Matsugaki, N., Takeda, K.: Phytochemistry: Structure of the blue cornflower pigment. *Nature* (2005), 436(7052), s. 791
57. Dangles, O., Elhabiri, M., Brouillard, R.: Kinetic and thermodynamic investigation of the aluminium anthocyanin complexation in aqueous solution. *Journal of Chemical Society Perkin Transactions* (1994), 2, s. 2587-2596

58. Toyama-Kato, Y., Kondo, T., Yoshida, K.: Synthesis of designed acylquinic acid derivatives involved in blue color development of *hydrangea* and their copigmentation effect. *Heterocycles* (2007), 72, s. 239–254
59. Příbela, A. *Analýza potravín. Skriptum STU*, Bratislava (1991)
60. on line: http://ec.europa.eu/food/fs/sfp/addit_flavor/flav13_en.pdf
61. Inami, O. et al.: Stability of anthocyanins of *Sambucus canadensis* and *Sambucus nigra*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1996), 44, s. 3090-3096
62. Bridle, P., Timberlake, C. F.: Anthocyanins as natural food colour-selected aspects. *Food Chemistry* (1997), 54(1-2), s. 103-109
63. Bakker, J., Timberlake, C. F.: Isolation, identification and characterization of new color-stable anthocyanins occurring in some red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1997), 45, s. 35-43
64. Freund, P. R., Washam, C. J., Maggion, M.: Natural color for use in foods. *Cereal Foods World* (1988), 33(7), s. 553-559
65. Ninfali, P., Angelino, D.: Nutritional and functional potential of *Beta vulgaris* cicla and rubra. *Fitoterapia* (2013), 89, s. 188–199
66. Stintzing, F. C., Carle, R.: Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology* (2004), 15(1), s. 19-38
67. Vulić, J. J. et al.: In vivo and in vitro antioxidant effects of beetroot pomace extracts. *Journal of Functional Foods* (2014), 6, s. 68-175
68. Mosshammer, M. R., Stintzing, F. C., Carle, R.: Colour studies on fruit juice blends from *Opuntia* and *Hylocereus cacti* and betalain-containing model solutions derived therefrom. *Food Research International* (2005), 38, s. 975–981
69. Wyler, H.: Der Farbstoff der roten Rinde. *Textil-Rundschau* (1963), 18, s. 111-117
70. Kugler, F., Stintzing, F. C., Carle, R.: Identification of betalains from petioles of differently colored Swiss Chard (*Beta vulgaris* L. ssp. cicla Alef. Cv. bright lights) by high-performance liquid chromatography – electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2004), 52, s. 2975–2981
71. Repo-Carrasco-Valencia, R. et al.: Flavonoids and other phenolic compounds in Andean indigenous grains: quinoa (*Chenopodium quinoa*), kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) and kiwicha (*Amaranthus caudatus*). *Food Chemistry* (2010), 120(1), s. 128–133
72. Ali, N. F., El-Mohamedy, R. S. R.: Eco-friendly and protective natural dye from red prickly pear (*Opuntia Lasiantha* Pfeiffer) plant. *Journal of Saudi Chemical Society* (2011), 15, s. 257–261
73. Guesmi, A. et al.: Dyeing properties and colour fastness of wool dyed with indicaxanthin natural dye. *Industrial Crops and Products* (2012), 37, s. 493–499
74. Schliemann, W. et al.: Betacyanins from plants and cell cultures of *Phytolacca americana*. *Phytochemistry* (1996), 42(4), s. 1039-1046
75. Mell, C. D.: *Phytolacca decandra*. *Textile Journal* (1922), 24, s. 436
76. Steglich, W.: Pilzfarbstoffe. *Chemie in unserer Zeit* (1975), 9, s. 117-123
77. Gandía-Herrero, F., García-Carmona, F.: Biosynthesis of betalains: yellow and violet plant pigments. *Trends in Plant Science* (2013), 18(6), s. 334-343
78. Strack, D., Steglich, W., Wray, V.: Betalains. *Methods in Plant Biochemistry*. Academic Press Orlando (1993), 8, s. 421-450
79. Reznik, H.: Betalaine. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* (1975), 88, s. 179-190
80. Sapers, G. M., Hornstein, J. S.: Varietal differences in Colorado properties and stability of red beet pigments, *Journal of Food Science* (1979), 44, s. 1245-1248
81. von Elbe, J. H. et al.: Quantitative analysis of betacyanins in red table beets (*Beta vulgaris*). *Journal of Food Science* (1972), 37, s. 932-934
82. Singer, J. W., von Elbe, J. H.: Degradation rates of vulgaxanthine – I. *Journal of Food Science* (1980), 45, s. 489-491
83. Saguy, I., Kopelman, I. J., Mizrahi, S.: Computer-aided determination of beet pigments. *Journal of Food Science* (1978), 43, s. 124-127
84. Dobiáš P. et al.: Využití extrakce nadkritickou tekutinou a extrakce v Soxhletově extraktoru pro izolaci a stanovení vybraných antioxidantů v bylinách. *Chemické Listy* (2010), 104, s. 572-581
85. Klejdus B.: Separace a identifikace isoflavonů v rostlinném materiálu. *Habilitační práce*. UPOL, Olomouc (2004)
86. Wilkinson A. P., Wähälä K., Williamson G.: Identification and quantification of polyphenol phytoestrogens in foods and human biological fluids. *Journal of Chromatography B* (2002), 777, s. 93-109

87. Šulcová, M.: Spektrofotometrické stanovení chelatace železa při různých pH. Diplomová práce. FaF UK, Hradec Králové (2011)
88. Terahara, N. et al.: Five new anthocyanins, ternatins, A3, B4, B3, B2 and D2, from *Clitoria ternata* flowers. *Journal of Natural Products* (1996), 59, s. 139-144
89. Waterman, P. G., Mole, S.: *Analysis of phenolic plant metabolites*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, (1994)
90. Kumšta, M.: Porovnání fenolických látek ve vínech z křížení (Merlot x S 13666) a (Frankovka x Svatovavřínecké). Ústav vinohradnictví a vinařství, MZLU, Lednice (2009)
91. Graham, H. D.: Stabilization of the Prussian blue color in the determinativ of polyphenols. *J Agric Food Chem* (1992), 40, s. 801-805
92. Barek, J., Opekar, F., Štulík, K.: *Elektroanalytická chemie*. Skriptum. Praha: Karolinum (2005)
93. Bontempelli, G., Toniolo, R.: Measurement methods: Electrochemical: Linear sweep and cyclic voltammetry. *Encyclopedia of electrochemical and power sources* (2009), s. 643-654
94. Berzins, T.; Delahay, P.: Theory of Irreversible Polarographic Waves - Case of Two Consecutive Electrochemical Reactions. *Journal of the American Chemical Society*, 75 (1953), s. 5716-5720
95. Moses, J. J., Ravi, N.: Application of grape skin powder extract on protein textile fabrics. *Man-made Textiles in India* (2003), 46, s. 338-344
96. Moses, J. J., Ravi, N.: Application of grape skin powder extract on protein textile fabrics. *Man-Made Textiles in India* (2003), 46(8), s. 295-300
97. Raja, N. V., Kala, J.: Dyeing of jute-cotton blends with grape skin waste. *Journal of the Textile Association* (2005), 66(3), s. 117-119
98. Moses, J. J.: Natural dyeing of silk using grape skin, tamarind, onion skin and turmeric. *Asian Textile Journal* (2002), 11(7), s. 68
99. Tichý, L., Tichá, I.: *Barvy z rostlin*. Rezekvítek Brno (1998)
100. Punrattanasin, N. et al.: Silk fabric dyeing with natural dye from mangrove bark (*Rhizophora apiculata* Blume) extract. *Industrial Crops and Products* (2015), 49, s. 122-129
101. Mongkholrattanasit, R., Kryštůfek, J., Wiener, J.: Dyeing and fastness properties of natural dye extracted from eukalyptus leaves using padding techniques. *Fibers and Polymers* (2010), 11, s. 346-350
102. Shahid, M. et al.: Recent advancements in natural dye applications: a review. *Journal of Cleaner Production*, 53 (2013), s. 310-331
103. Xing, Z. C. et al.: In vitro assessment of antibacterial activity and cytocompatibility of quercetin-containing PLGA nanofibrous scaffolds for tissue engineering. *Journal of Nanomaterials* (2012), s. 1-7
104. www.mapsofworld.com/world-top-ten/world-top-ten-wine-producer-countries.html [staženo 5.9.2015]
105. <http://www.ovine.cz/web/structure/10.html> [staženo 2.6.2013]
106. <http://www.vinopark.cz/magazin/clanek/mze:tuzemska-produkce-vina-loni-vzrostla-na-rekordnich-820000-hl--/> [staženo 2.6.2013]
107. <http://www.wineofczechrepublic.cz/historie-a-fakta/statistiky.html> [staženo 5.9.2015]
108. <http://vebr.webnode.cz/o-vine/odrudy-revy-vinne-v-cesku-s-prihlednutim-ke-svetu/> [staženo 5.9.2015]
109. <http://eagri.cz/public/web/mze/> [staženo 5.9.2015]
110. www.grapsud.com [staženo 5.9.2015]
111. Magnier, L.: Utilisation des sous-produits de la vigne dans l'alimentation animale. *Options Méditerranéennes - Série Séminaires No.16* (1991), s. 89-99
112. Morthup, R. R. et al.: Polyphenols as regulators of plant-litter-soil interactions in northern California's pygmy forest: a positive feedback? *Biogeochemistry* 1998), 42(1-2), s. 189-220
113. Parker, J.: Phenolics in black oak bark and leaves. *Journal of Chemical Ecology* (1977), 3(5), s. 489-496
114. *The Colour Index*. Society of Dyers and Colourists and American Association of Textile Chemists and Colourists, 3rd Edition (1971)
115. Furry, M. S., Viemont, B. M.: *Home dyeing with natural dyes*. U. S. Dept of Agriculture (1935), (reprint. by Thresh Publications)
116. Soares, S., Mateus, N., de Freitas, V.: Interaction of different classes of salivary proteins with food tannins. *Food Research International* (2012), 49(2), s. 807-813
117. Codorniu-Hernández, E. et al.: Theoretical study of flavonoids and proline interactions. Aqueous and gas phases. *Journal of Molecular Structure* (2003), 623(1-3), s. 63-73

118. Poncet-Legrand, C. et al.: Poly(l-proline) interactions with flavan-3-ols units: Influence of the molecular structure and the polyphenol/protein ratio. *Food Hydrocolloids* (2006), 20(5), s. 687-697
119. Yang, C. S., Lee, M. J.: Human salivary tea catechin levels and catechin esterase activities. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* (1999), 8, s. 83-89
120. Trnková, L. et al.: Study on the interaction of catechins with human serum albumin using spectroscopic and electrophoretic techniques. *Journal of Molecular Structure* (2011), 985(2-3), s. 243-250
121. Li, X., Hao, Y.: Probing the binding of (+)-catechin to bovine serum albumin by isothermal titration calorimetry and spectroscopic techniques. *Journal of Molecular Structure* (2015), 1091, s. 109-117
122. Aluigi, A. et al.: Study on the structure and properties of wool keratin regenerated from formic acid. *International Journal of Biological Macromolecules* (2007), 41(3), s. 266-273
123. Heijmen, F. H. et al.: Cross-linking of dermal sheep collagen with tannic acid. *Biomaterials* (1997), 18, s. 749-754
124. Madhan, B. et al.: Stabilization of collagen using plant polyphenol: Role of catechin. *International Journal of Biological Macromolecules* (2005), 37, s. 47-53
125. Punrattanasin, N. et al.: Silk fabric dyeing with natural dye from mangrove bark (*Rhizophora apiculata* Blume) extract. *Industrial Crops and Products* (2013), 49, s. 122-129
126. Berahou, A. et al.: Antibacterial activity of *Quercus ilex* bark's extracts. *Journal of Ethnopharmacology* (2007), 112(3), s. 426-429
127. Daglia, M.: Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology* (2012), 23, s. 174-181
128. Brown, D. J., Dattner, A. M.: Phytotherapeutic approaches to common dermatologic conditions. *Archives of Dermatology* (1998), 134, s. 1401-1404
129. Davis S. C., Perez, R.: Cosmeceuticals and natural products: wound healing. *Clinics in Dermatology* (2009), 27(5), s. 502-506
130. Mongkholrattanasit, R. et al.: UV protection and fastness properties of silk fabric dyed with *Garcinia Dulcis* (Roxb.) kurz bark by using pad-dry technique. A focus on effect of mordant concentration. *Advanced Materials Research* (2013), 821-822, s. 573-576
131. Mongkholrattanasit, R. et al.: An evaluation of UV protection property of silk fabric dyed with mangrove bark (*Rhizophora apiculata* Blume) extract. *Advanced Materials Research* (2013), 821-822, s. 560-563
132. Itoh, S., Ohara, S.: Fiber processing characteristics with bark extractives of *Acacia mearnsii* De wild. *Mokuzai Gakkaishi* (1999), 45(2), s. 157-163
133. König, J. R.: Zur Geschichte der Pigmente: Plinius und seine „Naturalis Historia“, Fette-Seifen-Anstrichmittel (1960), 62, s. 629-637
134. Reinking, K.: Die Herstellung von Harris-Tweed auf den äußeren Hebriden, *Kleppzigs Textilzeitschrift*. Heft (1938), 1, s. 2-7
135. <http://www.moraccini.it/libro1500/index.htm> [staženo 5.9.2015]
136. Hentschel, K.: Die Herstellung von Harris-Tweed auf den äußeren Hebriden, *Kleppzigs Textilzeitschrift*. Heft (1938), 1, s. 2-7
137. Grierson, S.: Vegetable Dyes of Scotland. *J Soc Dyers and Colourists* (1984), 100, s. 209-211
138. Leuchs, J. C.: Vollständige Farben- und Färbekunde, Zweiter Band Beschreibung der färbenden und farbigen Körper. Verlag von C. Leuchs & Co., Nürnberg (1846)
139. Lin, C.-Z. et al.: Investigation on the differences of four flavonoids with similar structure binding to human serum albumin. *Journal of Pharmaceutical Analysis* (2014), 4(6), s. 392-398
140. Bziková, K.: Světlostálost přírodních barviv. Diplomová práce. FT TUL, Liberec (2006)
141. Matúšů, M.: Rostlinná barviva. Diplomová práce. Katedra chemie, PF TUL, Liberec (2010)
142. www.chemspider.com [staženo 5.9.2015]
143. Grubešić, R. J. et al.: Flavonoid Content Assay: Prevalidation and Application on *Plantago L.* Species. *Acta Chimica Slovenica* (2007), 54, s. 397-406
144. Shen, Y. et al.: Total phenolics, flavonoids, antioxidant capacity in rice grain and their relations to grain color, size and weight. *Journal of Cereal Science* (2009), 49(1), s. 106-111
145. Ren, J. et al.: Complexation of flavonoids with iron: structure and optical signatures. *The Journal of Physical Chemistry B* (2008), 112, s. 1856-1850
146. Vestergaard, M., Kerman, K., Tamiya, E.: An electrochemical approach for detecting copper-chelating properties of flavonoids using disposable pencil graphite electrodes: Possible implications in copper-mediated illnesses. *Analytica Chimica Acta* (2005), 538(1-2), s. 273-281

147. Malešev, D., Kuntić, V.: Investigation of metal–flavonoid chelates and the determinativ of flavonoids via metal–flavonoid complexing reactions. *Journal of the Serbian Chemical Society* (2007), 72, s. 921
148. Brown, J. E. et al.: Structural dependence of flavonoid interaction with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. *Biochemical Journal* (1998), 330, s. 1173-1178
149. Mira, L. et al.: Interactions of flavonoids with iron and copper ions: A mechanism for their antioxidant activity. *Free Radical Research* (2002), 36, s. 1199-1208
150. Dimitrić Marković, J. M. et al.: A joint application of spectroscopic, electrochemical and theoretical approaches in evaluation of the radical scavenging activity of 3-OH flavones and their iron complexes towards different radical species. *Dalton Transactions* (2012), 41(24), s. 7295-7303
151. Guo, M. et al.: Iron-binding properties of plant phenolics and cranberry's bio-effects. *Dalton Transactions* (2007), 43, s. 4951-4961
152. Porfirio, D. A. et al.: Electrochemical study of the increased antioxidant capacity of flavonoids through complexation with iron(II) ions. *Electrochimica Acta* (2014), 141, s. 33-38
153. Trella, T., Frank, W.: Hexaaquaaluminium(III) tris(methanesulfonate). *Acta Crystallographica* (2012), E68, s. 1136-1137
154. Üstün Özgür, M. et al.: Dyeing cotton strips with natural dyes for improved fastness by dyeing with liquids cotannic acid and water soluble metal salts. 4th AACD congress Adnan Menderes University, (2004), Kuşadası, Turkey. *Proceeding book*, s. 240
155. Guesmi, A. et al.: Isolation, identification and dyeing studies of betanin on modified acrylic fabrics. *Industrial Crops and Products* (2012), 37, s. 342-346
156. Rosario, C. et al.: Color properties and stability of betacyanins from *Opuntia* fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2003), 50, s. 2772-2776
157. Frank, T.: Urinary pharmacokinetics of betalains following consumption of red beet juice in healthy humans. *Pharmacological Research* (2005), 52, s. 290-297
158. Filgueiras, A. V. et al.: Comparison of ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted digestion for determinativ of magnesium, manganem and zinc in plant samples by flame atomic absorption spektrometry. *Talanta* (2000), 53, s. 433-441
159. Slawomir, W., Mizrahi, Y.: Fruit flesh betacyanin pigments in *Hylocerus cacti*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2002), 60, s. 6086-6089
160. Liochev, S. I.: Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radical Biology and Medicine* (2013), 60, s. 1-4
161. Cotelle, N., Bernier, J. L., Cateau, J. P. et al.: Antioxidant properties of hydroxyflavones. *Free Radical Biology and Medicine* (1996), 20, s. 35-43
162. Pryor, C.: Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Annual Review of Physiology* (1986), 48, s. 657-667
163. Russo, A., Acquaviva, R., Campisi, A.: Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. *Cell Biology and Technology* (2000), 16, s. 91-108
164. Bagchi, D. et al.: Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease preventiv. *Toxicology* (2000), 148, s. 187-197
165. Joshi, S. S., Kuszynski, C. A., Bagchi, D.: The cellular and molecular basis of health benefits of grape seed proanthocyanidin extract. *Current Pharmaceutical Biotechnology* (2001), 2, s. 187-200
166. Skibola, C. F., Smith, M.: Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radical Biology and Medicine* (2000), 51, s. 813-826
167. Cos, P. et al.: Proanthocyanidins in health care: current and new trends . *Current Medicinal Chemistry* (2004), 11, s. 1345-1359
168. Davidov-Pardo, G., McClements, D. J.: Nutraceutical delivery systems: Resveratrol encapsulation in grape seed oil nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. *Food Chemistry* (2015), 167, s. 205-212
169. Yilmaz, Y., Toledo, R. T.: Health aspects of functional grape seed constituents. *Trends in Food Science & Technology* (2004), 15(9), s. 422-433
170. Baliga, M. S., Katiyar, S. K.: Review Chemoprevention of photocarcinogenesis by selected dietary botanicals. *Photochemical & Photobiological Sciences* (2006), 5, s. 243-253
171. Buchalska, M. et al.: Singlet oxygen generation in the presence of titanium dioxide materials used as sunscreens in suntan lotions. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* (2010), 213(2-3), s. 158-163

172. Perde-Schrepler, M. et al.: Grape seed extract as photochemopreventive agent against UVB-induced skin cancer. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* (2013), 118, s. 16-21
173. Velišek, J.: *Chemie potravin 2*, 1. vyd. Tábor: Ossis (1999)
174. Zeb, A.: Oxidation and formation of oxidation products of β -carotene at boiling temperature. *Chemistry and Physics of Lipids* (2012), 165, s. 277-281
175. Laughton, M. J. et al.: Antioxidant and pro-oxidant action of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. Effects on lipid peroxidation, hydroxyl radical generation and bleomycin-dependent damage to DNA. *Biochemical Pharmacology* (1989), 38(17), s. 2859-2865
176. Mira, L. et al.: Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism of their antioxidant activity. *Free Radical Research* (2002), 36(11), s. 199-208
177. Canada, A. T. et al.: Production of reactive oxygen species by dietary flavonols. *Free Rad Biol* (1999), 9, s. 2859-2865
178. Karthick, M., Stanley Mainzen Prince, P.: Preventive effect of rutin, a bioflavonoid, on lipid peroxides and antioxidants in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* (2006), 58, s. 701-707
179. Stanley Mainzen Prince, P., Karthick, M.: Preventive effect of rutin on lipids, lipoproteins and ATPases in normal and isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* (2007), 21, s. 1-6
180. Zatloukalová, L.: Vliv polyfenolických látek s železo chelatační aktivitou u modelu akutního infarktu myokardu a oxidačního stresu navozeného katecholaminy. Disertační práce. FaF UK, H. Králové (2011)
181. Potůček, J.: Bakterie zabíják: antibiotika nezabírají, máme se bát? (2010). On line: <http://www.vitalia.cz/clanky/bakterie-zabijak-antibiotika-nezabiraji-mame-se-bat/> [staženo 4.3.2013]
182. Yee, Y. K., Koo, M. W., Anti-Helicobacter pylori activity of Chinese tea: In vitro study. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* (2000), 14, s. 635–638
183. Cueva, C. et al.: Antibacterial activity of wine phenolic compounds and oenological extracts against potential respiratory pathogens. (2012). *Letters in Applied Microbiology* 54(6), s. 557–563
184. Haminiuk, C. W. I. et al.: Chemical, antioxidant and antibacterial study of Brazilian fruits. *International Journal of Food Science and Technology* (2011), 46, s. 1529–1537
185. Akiyama, H. et al.: Antibacterial action of several tannins against Staphylococcus aureus. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2001), 48, s. 487-491
186. Elizondo, A. M. and al.: Effect of tannins on the in vitro growth of Clostridium perfringens. *Veterinary Microbiology* (2010), 145, s. 308-314
187. Funatogawa, K. et al.: Antibacterial activity of hydrolyzable tannins derived from medicinal plants against Helicobacter pylori. *Microbiology and Immunology* (2004), 48, s. 251–261
188. Taguri, T., Tanaka, T., Kouno, I., Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing foodborne disease, *Biological and Pharmaceutical Bulletin* (2004), 27, s. 1965–1969
189. Hirai, I. et al.: Characterisation of anti-Staphylococcus aureus activity of quercetin. *International Journal of Food Science and Technology* (2010), 45, s. 1250–1254
190. Xing, Z.-C. et al.: In vitro assessment of antibacterial activity and cytocompatibility of quercetin-containing PLGA nanofibrous scaffolds for tissue engineering. *Journal of Nanomaterials* (2012), s. 1-7
191. Halkes, S. B. A. et al.: The use of tannic acid in the local treatment of burn wounds: Intriguing old and new perspectives. *Wounds* (2001), 13, s. 144-158
192. Kimata, M. et al.: Effect of luteolin, quercetin and baicalain on immunoglobulin E-mediated mediator release from human cultured mast cells. *Clinical & Experimental Allergy* (2000), 30, s. 501-508
193. Kim, T. J., Silva, J. J., Kim, M. K., Jung, Y. S.: Enhanced antioxidant capacity and antimicrobial activity of tannic acid by thermal processing. *Food Chemistry* (2010), 118, s. 740–746
194. Votava, M.: *Lékařská mikrobiologie*. Brno: Neptun, (2005)
195. Agati, G. et al.: Functional roles of flavonoids in photoprotection: New evidence, lessons from the past. *Plant Physiology and Biochemistry* (2013), 72, s. 35-45
196. Agati, G. et al.: Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science* (2012), 196, s. 67-76
197. Stahl, W., Sies, H.: Carotenoids and flavonoids contribute to nutritional protection against skin damage from sunlight. *Molecular Biotechnology* (2007), 37, s. 26-30
198. González, N. et al.: Potential use of Cytisus scoparius extracts in topical applications for skin protection against oxidative damage. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* (2013), 125, 83-89

199. Choquenot, B. et al.: Quercetin and rutin as potential sunscreen agents: determination of efficacy by an in vitro method. *Journal of Natural Products* (2008), 71(6), s. 1117-1118.
200. www.sciencezoom.cz [staženo 10.11.2014]
201. Bisanda, E. T. N., Ogola, W. O., Tesha, J. V.: Characterisation of tannin resin blends for particle board applications. *Cement and Concrete Composites* (2003), 25, s. 593-598
202. Ping, L. et al.: Extraction of condensed tannins from grape pomace for use as wood adhesives. *Industrial Crops and Products* 33 (2011), s. 260-257
203. Ping, L. et al.: Condensed tannins extraction from grape pomace: Characterization and utilization as wood adhesives for wood particleboard. *Industrial Crops and Products* 34 (2011), s. 907-914
204. Matamala, G., Smeltzer, W., Droguett, G.: Comparison of steel anticorrosive protection formulated with natural tannins extracted from acacia and from pine bark. *Corrosion Science* (2000), 42, s. 1351-1362
205. Rahim, A. A. et al.: Mangrove tannins and their flavanoid monomers as alternative steel corrosion inhibitors in acidic medium. *Corrosion Science* (2007), 19, s. 402-417
206. Wang, X. S., Li, Z. Z., Tao, S. R.: Removal of chromium (VI) from aqueous solution using walnut hull. *Journal of Environmental Management* (2009), 90, s. 721-729
207. Hashim, M. A. et al.: Remediation technologies for heavy metal contaminated groundwater. *Journal of Environmental Management* (2011), 92, s. 2355-2388
208. Munagapati, V. S. et al.: Biosorption of Cu(II), Cd(II) and Pb(II) by *Acacia leucocephala* bark powder: kinetics, equilibrium and thermodynamics. *Chemical Engineering Journal* (2010), 157, s. 357-365
209. Sengil, A., Özacar, M., Türkmenler, H.: Kinetic and isotherms studies of Cu(II) biosorption onto valonia tannin resin. *Journal of Hazardous Materials* (2009), 162, s. 1046 – 1052
210. Nakano, Y., Takeshita, K., Tsutsumi, T.: Adsorption mechanism of hexavalent chromium by redox within condensed-tannin gel. *Water research* (2001), 35, s. 496-500
211. Liao, X. et al.: Adsorption of UO_2^{2+} on tannins immobilized collagen fiber membrane. *Journal of Membrane Science* (2004), 243, s. 235-241
212. Collins, R. A. et al.: Removal of polyphenolic compounds from aqueous plant extract using polyamide minicolumns. *Biochemistry and Molecular Biology International* (1998), 45(4), s. 791-796
213. Perelshtein, I. et al.: Tannic acid NPs – Synthesis and immobilization onto a solid surface in a one-step process and their antibacterial and anti-inflammatory properties. *Ultrasonics Sonochemistry* (2014), 21(6), s. 1916–1920
214. Li, D. et al.: Green synthesis of gallic acid-coated silver nanoparticles with high antimicrobial activity and low cytotoxicity to normal cells. *Process Biochemistry*, (2015), 50(3), s. 357-366
215. Sankar, R. et al.: Green synthesis of colloidal copper oxide nanoparticles using *Carica papaya* and its application in photocatalytic dye degradation. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, (2014), 121(5), s. 746-750
216. Wei Su et al.: Antimicrobial finishing of cotton textile with nanosized silver colloids synthesized using polyethylene glycol. *Journal of the Textile Institute* (2011), 102(2), s. 150-156
217. Hebeish, A., El-Bisi, M. K., El-Shafei, A.: Green synthesis of silver nanoparticles and their application to cotton fabrics. *International Journal of Biological Macromolecules* (2015), 72, s. 1384–1390
218. Shateri-Khalilabad, M., Yazdanshenas, M. E., Etemadifar, A.: Fabricating multifunctional silver nanoparticles-coated cotton fabric. *Arabian Journal of Chemistry* (2013), in press
219. Xue, C.-H. et al.: Superhydrophobic conductive textiles with antibacterial property by coating fibers with silver nanoparticles. *Applied Surface Science* (2012), 258(7), s. 2468-2472
220. Ilic, V. et al.: The influence of silver content on antimicrobial activity and color of cotton fabrics functionalized with Ag nanoparticles. *Carbohydrate Polymers* (2009), 78, s. 564–569
221. Borůvková, K. et al.: Synthesis of gold nanoparticles in the polymer matrix. *Konference Nanocon Brno* (2013)
222. Silanikove, N., Perevolotsky, A., Provenza, F. D.: Use of tannin-binding chemicals to assay for tannins and their negative postingestive effects in ruminants. *Animal Feed Science and Technology* (2001), 91, s. 69-81
223. Gustavson, K. H.: Interaction of vegetable tannins with polyamides as proof of the dominant function of the peptide bond of collagen for its binding of tannins. *Journal of Polymer Science* (1954), 12(1), s. 317–324
224. Fuenmayor, C. A. et al.: Filtration of apple juice by nylon nanofibrous membranes. *Journal of Food Engineering* (2014), 122, s. 110–116
225. Demetrius, M.: Polyamide compositions for removal of polyphenols from liquids. Patent č. WO9800453 (A1) — 1998-01-08

226. Collins, R. A. et al.: Removal of polyphenolic compounds from aqueous plant extract using polyamide minicolumns. *Biochemistry and Molecular Biology International* (1998), 45(4), s. 791-796
227. Castellan, C. S. et al.: Mechanical characterization of proanthocyanidin-dentin matrix interaction. *Dental Materials* (2010), 26, s. 968-973
228. Castellan, C. S. et al.: Long-term stability of dentin matrix following treatment with variol natural collagen cross-linkers. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* (2011), 4, s. 1343-1350
229. Zhai, W. et al.: Crosslinking of decellularized porcine heart valve matrix by procyanidins. *Biomaterials* (2006), 27, s. 3684–3690
230. Han, B. et al.: Proanthocyanidin: A natural crosslinking reagent for stabilizing collagen matrices. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* (2003), 65A(1), s. 118-124
231. <https://chempolymerproject.wikispaces.com/Collagen++B+rgam> [staženo 5.9.2015]
232. www.chemnet.com [staženo 5.9.2015]
233. Wang, X. et al.: Procyanidins-crosslinked aortic elastin scaffolds with distinctive anti-calcification and biological properties. *Acta Biomaterialia* (2015), 16, s. 81-93
234. Isenburg, J. C. et al.: Structural requirements for stabilization of vascular elastin by polyphenolic tannins. *Biomaterials* (2006), 27, s. 3645–3651
235. Isenburg, J. C., Simionescu, D. T., Vyavahare, N. R.: Elastin stabilization in cardiovascular implants: improved resistance to enzymatic degradation by treatment with tannic acid. *Biomaterials* (2004), 25, s. 3293–3302
236. McClure, R. D., Allen, C. I.: Davidson tannic acid treatment of burns: Ten year results. *The American Journal of Surgery* (1935), 28(2), s. 370-388
237. Hupkens et al.: Tannic acid as a topical agent in burns: historical considerations and implications for new developments. *Burns* (1995), 21, s. 57-61
238. [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Promotional leaflet for Wellcome%27s tannic acid jelly Tannafax Wellcome_L0041462.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Promotional_leaflet_for_Wellcome%27s_tannic_acid_jelly_Tannafax_Wellcome_L0041462.jpg) [staženo 5.9.2015]
239. Bart, S. et al.: Transaminase and alkaline phosphatase activity in the serum of burn patients treated with highly purified tannic acid. *Burns* (2002), 28, s. 449–453
240. Halkes, S. B. A. et al.: Treatment of burns: new perspectives for highly purified tannic acid? *Burns* (2001), 27, s. 299–300
241. Nečas, E. et al.: *Obecná patologická fyziologie*. Karolinum, Praha (2009)
242. Li, K. et al.: Tannin extracts from immature fruits of *Terminalia chebula* Fructus Retz. promote cutaneous wound healing in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine* (2011), 11, s. 86
243. Nayak, B. S., Sandiford, S., Maxwell, A.: Evaluation of the Wound-healing Activity of Ethanolic Extract of *Morinda citrifolia* L. Leaf. *Evidence-based medicine and complementary and alternative medicine teaching in UK medical courses* (2009), 6(3), s. 351–356
244. Frank, D. N. et al.: Microbial diversity in chronic open wounds. *Wound Repair and Regeneration* (2009), 17(2), s. 163-72
245. Gomathi, K. et al.: Quercetin incorporated collagen matrices for dermal wound healing processes in rat. *Biomaterials* (2003), 24, s. 2767–2772
246. Lin, C.-F. et al.: Anti-inflammatory activity and percutaneous absorption of quercetin and its polymethoxylated compound and glycosides: The relationships to chemical structures. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* (2012), 47(5), s. 857–864
247. Wang, L. et al.: Quercetin, a flavonoid with anti-inflammatory activity, suppresses the development of abdominal aortic aneurysms in mice. *European Journal of Pharmacology* (2012), 690, s. 133–141
248. Vik, M.: *Základy měření barevnosti I*. Skriptum TUL, Liberec (1995)
249. Hustvedt, G., Cox Crews, P.: The Ultraviolet Protection Factor of Naturally-pigmented Cotton. *Journal of Cotton Science* (2005), 9(47), s. 47-55
250. Diffey, B. L., Mckinlay, A. F.: A reference action spectrum for ultraviolet induced erythema in human skin. *CIE J* (1987), 6, s. 17-22
251. <http://www.temis.nl/uvradiation/info/uvindex.html> [staženo 5.9.2015]
252. AATCC test method 16-1998: Colorfastness to light. On line: <http://www.textileinstruments.net/okit88/UploadFiles/AATCC%2016-Colorfastness%20to%20light.PDF> [staženo 5.9.2015]
253. www.philinea.cz/pdf/osram/specialni_zarice/vysokotlake-uv-zarice-ultramed.pdf [staženo 30.4.2013]

254. Vyhláška Ministerstva zdravotnictví ČR č. 84/2001 Sb. o hygienických požadavcích na hračky a výrobky pro děti ve věku do 3 let. On line:
<http://portal.gov.cz/app/zakony/zakon.jsp?page=0&nr=84~2F2001&rpp=15#seznam> [staženo 1.8.2014]
255. DIN ISO 14502-1 Determination of substances characteristic of green and black tea - Part 1: Content of total polyphenols in tea- Colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent (ISO 14502-1:2005 + Corrigendum 1:2006)
256. Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventós, R. M.: Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Meth.Enzymol.* 299, 1999, s. 152-178
257. Československý lékopis: Pharmacopoea Bohemoslovaca. 4. vyd. Praha: Avicenum, (1987)
258. Sharma, O. P., Bhat, T. K.: DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry* (2009), 113(4), s. 1202–1205
259. AATCC test method 100-2012: Antibacterial Finishes on Textile Materials:Assessment of. On line:
http://drywired.com/wp-content/uploads/2015/07/Textile_Bacteria.pdf [staženo 5.8.2015]
260. http://www.wineofczechrepublic.cz/files/aktuality/souvisejici_soubory/files_aktuality_3448/SVZRevavinna_vino2013.pdf [staženo 5.8.2015]
261. Xia, Z. et al.: Unraveling the mechanism of thermal and thermo-oxidative degradation of tannic acid. *Thermochimica Acta* (2015), 605, s. 77-85
262. Kim, T. J., Silva, J. L., Jung, Y. S.: Enhanced functional properties of tannic acid after thermal hydrolysis. *Food Chemistry* (2011), 126(1), s. 116-120
263. Kryštůfek, J., Wiener, J.: Barvení textilií I. Skriptum TUL, Liberec (2008)
264. Minganti, V. et al.: The bark of holm oak (*Quercus ilex, L.*) for airborne Cr(VI) monitoring. *Chemosphere* (2015), 119, s. 1361-1364
265. Zhiyanski, M. et al.: Cesium-137 contamination of oak (*Quercus petrae Liebl.*) from sub-mediterranean zone in South Bulgaria. *Journal of Environmental Radioactivity* (2010), 101(10), s. 864-868
266. Fogh, C. L., Andersson, K. G.: Dynamic behaviour of 137Cs contamination in trees of the Briansk region, Russia. *Science of The Total Environment* (2001), 269(1-3), s. 105-115
267. Cheynier, V. et al.: The structures of tannins in grapes and wines and their interactions with proteins. *Wine: ACS Symposium Series 661/8*, Washington DC (2007), s. 81-93
Photochem Photobiol Sci. 2006 Feb; 5(2):243-53.
268. Meléndez-Martínez, et al.: HPLC analysis of geometrical isomers of lutein epoxide isolated from dandelion (*Taraxacum officinale F. Weber ex Wiggers*). *Phytochemistry* (2006), 67(8), s. 771-777
269. Saito, K. et al.: Isolation and enzymatic synthesis of an ester alkaloid, (-)-3β-hydroxy-13α-tigloyloxylupanine, from *Cytisus scoparius*. *Phytochemistry* (1994), 36(2), s. 309-311
270. Es-Safi, N., Cheynier, V., Moutounet, M.: Role of aldehydic derivatives in the condensation of phenolic compounds with emphasis on the sensorial properties of fruit-derived foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2002), 50, s. 5571-5585
271. Ribéreau-Gayon, P. et al.: *Traité d'oenologie. vol. 2. Chimie du vin, stabilisation et traitements.* Dunod, Paris (1998)

12. Práce autora se vztahem ke studované problematice

RECENZOVANÉ A IMPAKTOVANÉ ČASOPISY

- Křížová, H., Wiener, J.: *Colour changes and instability of anthocyanins*. ACC Journal, XVIII/1 , Issue A, (2012), ISSN: 1803-9782, s. 30-41
 - Křížová, H., Wiener, J.: *Polyphenols from grape pomace and their UV radiation testing in carboxymethyl cellulose films*. WASTE FORUM, Vol. 2 (2013), ISSN: 1804-0195, s. 76-83
 - Křížová, H., Wiener, J.: *Development of carboxymethyl cellulose/polyphenols gels for textile applications*. Autex Research Journal, Vol. 13, Issue 2 (2013), ISSN: 1470-9589, s. 33-36
 - Křížová, H.: *Testování světlostálosti vlněné tkaniny barvené anthokyaniny z výlisků z modré révy* WASTE FORUM, Vol. 2 (2014), ISSN: 1804-0195, s. 88-94
 - Křížová, H.: *Optimalizace podmínek vodné extrakce anthokyanů z révových výlisků pro účely ekologického barvení textilií*. WASTE FORUM, Vol. 1 (2015), ISSN: 1804-0195, s. 12-19
 - Křížová, H.: *Dyeing of woollen and polyamide fabrics by beetroot waste from cannery*. WASTE FORUM, Vol. 2 (2015), ISSN: 1804-0195, s. 57-63
- Křížová, H.: *Changes in the antioxidant activity of polyphenols from grape pomace after interaction with UV radiation*. ACC Journal, Vol. 21, Issue 1 (2015), ISSN: 1803-9782, s. 70-76

PUBLIKACE V PROCESNÍM ŘÍZENÍ

- Křížová, H., Wiener, J.: *Dyeing of woollen fabrics pre-treated with tin chloride using yellow blossoms from Central European countryside*. Autex Research Journal
- Křížová, H., Wiener, J.: *Comparison of UV protective properties of woollen fabrics dyed with yellow natural dyes from different plant sources*. Autex Research Journal
- Křížová, H., Wiener, J.: *Colour and antibacterial properties of polyamide fabric dyed using extract from oak bark*. Autex Research Journal

FULLTEXTY V KONFERENCEČNÍCH SBORNÍCÍCH

- Křížová, H., Wiener, J., Grégr, J.: *Barevné změny anthokyanů*. Zpravodaj spolku textilních chemiků a koloristů. 43. konference TEXCHEM (2011), Pardubice, ČR. ISSN 1214-8091
- Křížová, H., Wiener, J.: *The possibility of textile dyeing with anthocyanins*. Sborník konference. 18. mezinárodní konference STRUTEX, TUL, Liberec (2011), ISBN: 978-80-7372-789-4
- Křížová, H., Wiener, J.: *Controlled release of polyphenols from thermal crosslinked carboxymethylcellulose*. Sborník konference. 19. mezinárodní konference STRUTEX, TUL, Liberec (2012), ISBN: 978-80-7372-913 -4
- Křížová, H., Wiener, J.: *Využití výlisků z modré révy v textilním průmyslu*. Sborník konference. 8. sympozium ODPADOVÉ FÓRUM, Kouty nad Desnou, Czech Rep. (2013), ISBN: 978-80-85990-22-5
- Křížová, H.: *Porovnání antioxidačních vlastností kyseliny askorbové a kondenzovaných taninů*. Sborník konference. DOKTORANDSKÝ WORKSHOP (2013)
- Křížová, H., Wiener, J.: *Synthesis of silver nanoparticles using condensed and hydrolysable tannins*. Sborník konference. 5. mezinárodní konference NANOCON, Brno, Czech Rep. (2013), ISBN: 978-80-87294-44-4.
- Křížová, H.: *Cyklická voltametrie aplikovaná na přírodní polyfenoly a antioxidanty*. Sborník konference. 23. chemicko-technologická konference APROCHEM (2014), Hustopeče, ČR
- Křížová, H.: *Testování světlostálosti textilií barvených přírodními barvivy ze zemědělských odpadů*. Sborník konference. 9. sympozium Odpadové fórum, Hustopeče, ČR (2014), ISBN: 978-80-210-6832-2
- Křížová, H., Rotková, J.: *Green synthesis of copper-based nanostructures using tannic acid and testing of their antibacterial properties*. Sborník konference. 6. mezinárodní konference NANOCON, Brno, ČR (2014), ISBN: 978-0-12-387720-8
- Křížová, H., Wiener, J.: *Preparation of iron gall nut ink and study of the nanoparticles stability*. Sborník konference. 1. mezinárodní konference NART, Liberec, ČR (2015)
- Křížová, H., Wiener, J.: *Functionalisation of polyamide nanofibres by tannin from oak bark extract and testing of its pH dependent stability*. Sborník konference. 7. mezinárodní konference NANOCON, Brno, ČR (2015)