

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra chemie

Stanovení fenolických látek v rostlinném materiálu

Bakalářská práce

Autor:	S12309 Ludmila Neuwirthová
Studijní program:	B1407 Chemie
Studijní obor:	Chemie se zaměřením na vzdělávání Biologie se zaměřením na vzdělávání
Vedoucí práce:	Ing. Karel Musil

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Zadání bakalářské práce

Autor:	Ludmila Neuwirthová
Studijní program:	B1407 Chemie
Studijní obor:	Chemie se zaměřením na vzdělávání Biologie se zaměřením na vzdělávání
Název práce:	Stanovení fenolických látek v rostlinném materiálu
Název práce v Aj:	Total phenolics determination in plant material
Cíl a metody práce:	Teoretická část se bude zabývat podrobným popisem tématu za využití dostupných odborných zdrojů. Bude zpracován popis, historie, využití a současný pohled na problematiku tématu. Experimentální část se bude zabývat vývojem metody pro extrakci fenolických látek z rostlinného materiálu a optimalizací stanovení množství fenolických látek v extrahovaném materiálu metodou spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti za využití reakce s Folin-Ciocalteu činidlem.
Garantující pracoviště:	Katedra chemie přírodovědecké fakulty UHK
Vedoucí práce:	Ing. Karel Musil
Datum zadání práce:	26. 01. 2015
Datum odevzdání práce:	24. 07. 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedla všechny prameny, z kterých jsem vycházela.

V Hradci Králové dne 24. 7. 2015

Ludmila Neuwirthová

.....

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat Ing. Karlu Musilovi za odbornou konzultaci, trpělivost a ochotu, kterou mi věnoval při tvorbě bakalářské práce.

Anotace

NEUWIRTHOVÁ, L. *Stanovení fenolických látek v rostlinném materiálu*. Hradec Králové, 2015. Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí bakalářské práce Karel Musil.

Teoretická část se bude zabývat podrobným popisem tématu za využití dostupných odborných zdrojů. Bude zpracován popis, historie, využití a současný pohled na problematiku tématu. Experimentální část se bude zabývat vývojem metody pro extrakci fenolických látek z rostlinného materiálu a optimalizací stanovení množství fenolických látek v extrahovaném materiálu metodou spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti za využití reakce s Folin-Ciocealtea činidlem.

Klíčová slova

Fenolické látky, UV/VIS spektrometrie, Folin-Ciocealtea činidlo, kvalita krmiva

Annotation

NEUWIRTHOVÁ, L. *Total phenolics determination in plant material*. Hradec Králové, 2015. Bachelor thesis at Faculty of Chemistry University of Hradec Králové. Thesis supervisor Karel Musil.

The theoretical part will be dealing with a in-depth description of the topic with use of available professional resources. Description, history, usage and current look on the problematic will be made. The experimental part will be dealing with method development about extraction of total phenolics from plant material and with optimisation of determinating the amount of total phenolics in the extracted material with use of spectrophotometric method in ultraviolet and visible area with use of reaction with Folin-Ciocealtea agent.

Key words

Total phenolics, UV/VIS spectrophotometry, Folin-Ciocealtea agent, feed quality

Obsah

Úvod a cíle práce.....	9
Teoretická část	10
1 Fenolické látky	10
1.1 Historie.....	11
1.2 Klasifikace	11
1.3 Antioxidační působení.....	14
1.3.1.1. Reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species, ROS).....	15
1.3.1.2. Reaktivní formy dusíku (RNS)	15
2 Molekulová absorpční spektrometrie v UV/VIS oblasti.....	16
2.1 Historie.....	16
2.2 Princip UV/VIS spektrofotometrie	16
2.2.1 Spektrální oblasti	17
2.2.2 Komplementarita barev.....	17
2.3 Základní vztahy a Lambert – Beerův zákon	18
2.4 Instrumentace	19
3 Stanovení pomocí Folin – Ciocalteuova činidla	22
3.1 Folin-Ciocalteuovo činidlo	22
3.2 Princip stanovení fenolických látek při použití Folin-Ciocalteuova činidla.....	23
4 Předchozí výzkumy v této oblasti	24
4.1 Antioxidační aktivita a fenolické sloučeniny v 32 vybraných rostlinách (2007).....	24
4.2 Vliv celkového množství fenolických látek na antioxidační kapacitu obilovin (2009).....	24
4.3 Celkový obsah fenolických látek v okrasných kultivarech <i>Origanum vulgare</i> (2009).....	24
5 Jiné metody stanovení obsahu fenolických látek.....	26
5.1 Extrakce látek z různých typů matric.....	26
5.1.1 Obecné rozdělení typů extrakcí.....	26
5.1.2 Extrakční metody pro izolaci fenolických látek	27
5.2 Separační a analytické metody fenolických látek.....	28
Praktická část.....	31
6 Materiál.....	31

6.1	Pícniny	31
6.1.1	<i>Dactylis glomerata</i> – srha laločnatá.....	31
6.1.2	Silážování.....	32
7	Analýza vzorků.....	33
7.1	Zpracování materiálu pro analýzu	33
7.1.1	Chemikálie.....	35
7.2	Příprava vzorků pro analýzu	35
7.2.1	Vážení a extrakce vzorků	35
7.2.2	Filtrace vzorků	35
7.2.3	Vlastní příprava vzorků	35
7.3	Stanovení kalibrační křivky	35
7.4	Stanovení celkového obsahu fenolických látek v několika odrůdách <i>Dactylis glomerata</i>	37
	Diskuze	39
	Závěr.....	43
	Zdroje.....	44

Úvod a cíle práce

Práce je založena na stanovení obsahu fenolických látek v rostlinném materiálu a bude se zabývat popisem tématu za využití dostupných odborných zdrojů.

Teoretická část bude věnována popisu těchto sloučenin a jejich klasifikaci. V další části jsem se zaměřila na metody jejich stanovení, zejména pak UV/VIS spektroskopii, její historii a instrumentaci a další metody stanovení fenolických sloučenin. Velká část se bude zabývat samotným Folin-Ciocalteuovým roztokem. V poslední kapitole teoretické části bude zmíněno pícninářství a silážování vzhledem k materiálům použitým v praktické části.

Samotná praktická část se poté bude zabývat vyvinutím vhodné metody stanovení látek při UV/VIS spektroskopii za použití Folin-Ciocalteuova činidla. Práce byla uskutečněna se vzorky deseti druhů srhy laločnaté (*Dactylis glomerata*) a jejich silážovaných hmot, které byly připraveny za použití různých aditiv.

Cílem práce je studium fyziologicky aktivních fenolických látek, které jsou obsaženy v materiálech s podstatným významem v potravinářství a výživě člověka. Fenolické látky představují významnou část sloučenin s antioxidačními vlastnostmi. Tento fakt vedl k aktuálnímu zvýšení zájmu o studium těchto sloučenin obsažených v rostlinách, zkoumání souvislosti mezi příjmem fenolických látek v potravě a rizikem onemocnění spojených s porušením antioxidační rovnováhy.

V bakalářské práci používám zejména cizojazyčné články vzhledem k nízké dostupnosti článků na podobné téma v mateřském jazyce.

Teoretická část

1 Fenolické látky

Fenolické látky patří mezi sekundární metabolity všech rostlin, které se syntetizují během jejich obvyklého vývoje. Jsou to sloučeniny, které mají jednu nebo více hydroxylových skupin přímo připojených na aromatický kruh.

Fenoly jsou v mnohém podobny alifatickým alkoholům, na rozdíl od nich se ale chovají ve vodném prostředí jako velmi slabé kyseliny ($pK_A \sim 10$). Jedná se většinou o krystalické látky, omezeně rozpustné ve vodě, často charakteristické vůně. Polyfenoly jsou sloučeniny, které mají více než jednu fenolickou hydroxylovou skupinu připojenou k jednomu nebo více benzenovým jádrům. [3,21]

Tyto látky mají vliv na zabarvení, vůni, hořkost, a oxidační stabilitu rostlin, do značné míry ale ovlivňují i jejich kvalitu a stravitelnost. Jejich hlavní funkcí je ochrana před patogeny. Předmětem výzkumů se staly především v souvislosti s ochranou před reaktivními formami kyslíku, který vzniká v rostlinách v důsledku stresu vyvolaného UV radiací, infekcí, zraněním, atd. Fenolické sloučeniny jsou považovány za molekuly s nejvyšším potenciálem k neutralizaci volných radikálů. Proto je jejich kvantifikace běžná praxe v různých oblastech potravinářského výzkumu. [1, 2, 4, 21]

Jejich denní příjem byl odhadnut na 1 g, proto jsou považovány za nejrozšířenější sloučeniny s redukčními účinky v potravě. Jejich příjem je vyšší, než příjem antioxidantů (tokoferoly, karoteny). V současné době se klade důraz na identifikaci přírodních zdrojů a izolaci aktivních antioxidantů molekul vzhledem k udržení zdravého biologického systému. [8, 19]

Běžné manipulace s potravinami rostlinného původu, jako je chlazení a zmrazování, pasterace a kuchyňské úpravy pravděpodobně obsah biologicky aktivních forem fenolických látek podstatně neovlivňují. [24]

1.1 Historie

Příjem a metabolismus fenolických látek u člověka patřily v nedávné době k málo prostudovaným oblastem výzkumu, zejména ohledně jejich množství v potravinách.

Důležitá etapa výzkumu zdravotního efektu rostlinných fenolů byla zahájena v americkém Národním ústavu pro rakovinu na počátku 80. let minulého století. Tato data byla ale v tomto případě nadsazená, jelikož nebyly zahrnuty všechny aspekty ovlivňující měření. Charakteristiky biologické aktivity ale i při opravených koncentračních hodnotách zůstaly v platnosti.

V období let 2001-2002 bylo dosaženo pokroku v poznání výskytu, chemické struktury, fyziologického významu a metabolismu fenolů a polyfenolů obsažených v potravě rostlinného původu.

Dosud bylo izolováno a strukturně identifikováno přes 8000 přírodních látek převážně fenolické a polyfenolické povahy. [24]

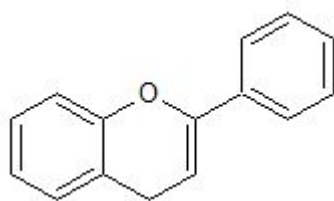
Fenolické látky představují významnou část látek s antioxidačními vlastnostmi přítomných v potravě. Proto je současné době diskutována souvislost mezi příjmem těchto látek v potravě a rizikem onemocnění spojených s porušením antioxidační rovnováhy.

Nedávné výzkumy prokazují schopnosti fenolických látek zhaset reaktivní kyslíkové radikály a omezovat jejich tvorbu chelatací iontů přechodných kovů (především kationtů železa), které jsou schopny generovat vysoce reaktivní hydroxylové radikály. Dále chrání lipoproteiny o nízké hustotě před oxidační modifikací, která je považována za jeden z klíčových dějů při rozvoji aterosklerózy. Mohou také působit proti vzniku krevních sraženin, čímž snižují riziko infarktu myokardu nebo mozkové mrtvice. [19]

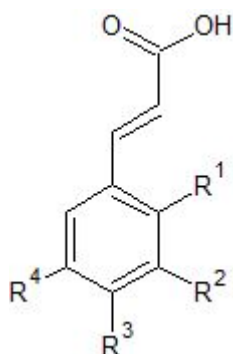
1.2 Klasifikace

Pojem fenolické sloučeniny pokrývá velmi velkou a různorodou skupinu chemických sloučenin. Podle struktury rozdělujeme fenolické látky do několika skupin. Z nich největší část tvoří flavonoidy ($C_6-C_3-C_6$), odvozené od heterocyklického flavanu (obr. 1). Další velkou skupinu tvoří aromatické hydroxykyseliny, kam patří např. deriváty kyseliny skořicové (C_3-C_6), (obr. 2) a kyseliny benzoové (obr. 3). Do ostatních skupin patří např. jednoduché fenoly, flavany, flavony, flavanony, anthokyanidy, stilbeny, quinony, ligniny, taniny, atd. Na celkovém příjmu polyfenolů se flavanoidy podílí asi ze dvou třetin, fenolické kyseliny jednou třetinou a ostatní polyfenoly (např. lignany a stilbeny) tvoří minoritní podíl. [19]

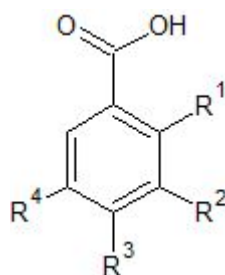
V příložené tabulce se nacházejí fenolické látky zařazené podle struktury.



Obr. 1. Struktura flavanu



Obr. 2. Kyselina skořicová a její deriváty



Obr. 3. Kyselina benzoová a její deriváty

k. kávová: $R_2 = R_3 = OH$
 k. *o*-kumarová: $R_1 = OH$
 k. *m*-kumarová: $R_2 = OH$
 k. *p*-kumarová: $R_3 = OH$
 k. ferulová: $R_2 = OCH_3,$
 $R_3 = OH$

k. gallová: $R_2 = R_3 = R_4 = OH$
 k. gentisová: $R_1 = R_4 = OH$
 k. vanilová: $R_2 = OCH_3, R_3 = OH$
 k. syringová: $R_2 = R_4 = OCH_3,$
 $R_3 = OH$

Struktura	Třída
C₆	jednoduché fenoly
C₆ - C₁	fenolické kyseliny a jejich deriváty
C₆ - C₂	acetofenony a fenylctové kyseliny
C₆ - C₃	kyselina skořicová, její aldehydy a alkoholy
C₆ - C₃	kumaríny, isokumaríny
C₁₅	chalkony, dihydrochalkony
C₁₅	flavany
C₁₅	flavony
C₁₅	flavanony
C₁₅	flavanonoly
C₁₅	anthokyanidy
C₁₅	anthokyaniny
C₃₀	biflavony
C₆ - C₁ - C₆, C₆ - C₂ - C₆	benzofenony, xanthony, stilbeny
C₆, C₁₀, C₁₄	quinony
C₁₈	betakyaniny
Lignany, neolignany	dimery a oligomery
Lignin	polymery
Tanniny	polymery

Tab. 1. Rozdělení fenolický látek [21]

Flavonoidy jsou jedny z nejběžnějších fenolických látek, široce nacházené v rostlinných tkáních a často jsou spolu s karotenoidy a chlorofyly zodpovědné za jejich modré, fialové, žluté, oranžové a červené zbarvení. Flavonoidy zahrnují flavony, flavonoly, isoflavonoly, anthokyaniny, anthokyanidy, proanthokyanidy a katechiny. Všechny flavonoidy jsou odvozeny od aromatických aminokyselin fenylalaninu a tyrosinu.

Fenolické kyseliny jsou jednou z dalších hlavních tříd fenolických látek v rostlinné říši a vyskytují se ve formě esterů, glykosidů nebo amidů, zřídka ve volné formě. Fenolické kyseliny mají dvě základní struktury: kyselinu hydroxyskořicovou a hydroxybenzoovou. [9]

1.3 Antioxidační působení

Procesy oxidace jsou podstatné v řízení energie všech živých organismů a jsou proto nedílnou součástí buněčných mechanismů. Nadměrná tvorba volných radikálů (oxidační stres) a snížení antioxidační obrany však vede k nástupu mnoha onemocnění a urychlení stárnutí. [7]

Antioxidační aktivita potravin je velmi důležitá, protože s ní jsou spojovány pozitivní účinky na zdraví, zejména v prevenci kardiovaskulárních chorob, rakoviny, osteoporózy a podle nedávných výzkumů i v prevenci neurodegenerativních chorob a cukrovky, které se však podařilo prokázat pouze v pokusech in vitro, nebo na zvířatech. [19]

Antioxidační účinek polyfenolů je komplexní a lze jej přičíst několika mechanismům:

1. Mnoho flavonoidů i dalších polyfenolů inhibuje enzymy zodpovědné za produkci radikálů. Inhibují i další enzymy, které se na tvorbě volných radikálů podílejí (cyklooxygenasa, lipoxygenasa, atd.)
2. Mnohé polyfenoly vytváří chelátové vazby s kovy, především s mědí a dvojmocným železem. Volné ionty těchto kovů se totiž účastní při tvorbě reaktivních kyslíkových forem.
3. Řada polyfenolů je snadno oxidovatelná a schopna redukovat některé volné radikály s oxidačními účinky, např. superoxidový, peroxylový, alkoxylový a hydroxylový. Sami se přitom většinou přeměňují na málo reaktivní fenoxyllový radikál nebo neradikálové chinoidní struktury.

1.3.1 Volné radikály

Volné radikály jsou atomy, molekuly či ionty schopné samostatné existence, které mají ve svém elektronovém obalu jeden nepárový elektron, eventuálně i více nepárových elektronů. Snaží se proto získat další elektron a doplnit si tak elektronový pár do stabilní elektronové konfigurace. Z toho pramení jejich velká reaktivita a omezená doba existence.

V organismu vzniká z normální částice přijetím (redukcí) či ztrátou (oxidací) elektronu. Další možností je homolytické štěpení kovalentní chemické vazby, kdy si každá částice ponechá jeden elektron. Tyto částice pak reagují nejen s ostatními volnými radikály, ale i s intaktními molekulami a tím vytvářejí další volný radikál. Tento děj má tendenci pokračovat formou řetězové reakce. Volné radikály mohou napadat lipidy v lipoproteinech a buněčných membránách, nukleové kyseliny, sacharidy i bílkoviny včetně enzymů, což může vést k těžkému poškození tkání a celých orgánů.

Volné radikály vznikají v organismu při řadě fyziologických či patologických procesů, např. rozpadem fagocytů při zánětu, při syntéze prostaglandinů, při vzniku kyseliny močové (při úrazech, pooperačních stavů), při svalovém výkonu a

při hyperglykémii. Volné radikály však mohou vznikat i působením vnějších faktorů, např. působením ultrafialového světla, při obsahu škodlivin ve vzduchu, kouření, odbourávání alkoholu a z potravy.

Radikálová reakce může být ukončena setkáním dvou radikálů, častěji ale setkáním s látkou, ze které vzniká stabilnější radikál, který je schopný delší existence a může být odstraněn jiným způsobem. Protože je z elektrochemického hlediska ztráta elektronu oxidace, mají volné radikály na tkáň oxidací účinek.

Organismy na jedné straně využívají volné radikály ve svůj prospěch – k ničení fagocytovaných mikroorganismů, při ovulaci a oplodnění vajíčka, volné radikály mají signalizační význam v buňce apod. Na druhé straně mohou volné radikály organismus závažně poškodit a známe množství tzv. nemocí z volných radikálů (ateroskleróza, *diabetes mellitus*, zhoubné novotvary, záněty, aj.), ve kterých hrají roli iniciátorů, nebo při rozvoji komplikací. [5, 10, 18]

Volné radikály v organismu je možné rozdělit do dvou základních skupin.

1.3.1.1. Reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species, ROS)

Nejběžnějším radikálem v organismu je tzv. superoxid. Ten vzniká přijetím jednoho elektronu molekulou kyslíku. Tento radikál může být v dalších reakcích přeměňován na množství dalších reaktivních sloučenin. Přijetím elektronu superoxidem vzniká peroxid vodíku. Pokud je k dispozici ještě jeden elektron, peroxid vodíku se rozpadne na vodu a hydroxylový radikál (Fentonova reakce). Tato reakce probíhá v dýchacím řetězci mitochondrií v centru enzymu cytochromoxidázy, kde v této vazbě nejsou radikály škodlivé. V případě volného výskytu se jedná o nejnebezpečnější hydroxylový radikál, protože má extrémně nízkou dobu života a zaniká napadením molekul prakticky v místě svého vzniku.

Mezi tyto radikály můžeme zařadit i singletový kyslík, který vzniká v lidském těle např. při absorpci světla některými pigmenty. [5]

1.3.1.2. Reaktivní formy dusíku (RNS)

Nejvýznamnějším představitelem je oxid dusnatý (NO), který vzniká z L-argininu za pomoci enzymů nazývaných syntázy oxid dusnatého. NO se vyskytuje v organismu ve velmi nízkých koncentracích, má krátký biologický poločas. Jako radikál reaguje s většinou biomolekul velmi pomalu. Jeho nebezpečnost spočívá v tom, že může v dalších reakcích poskytovat celou řadu velmi reaktivních sloučenin (např. peroxyinitrit). [5]

2 Molekulová absorpční spektrometrie v UV/VIS oblasti

UV/VIS spektrometrie se řadí mezi klasické metody spektrální analytické chemie. Princip této metody je založen na absorpci ultrafialového a viditelného záření, proto tuto metodu můžeme zařadit mezi absorpční spektrální metody.

2.1 Historie

Ultrafialová a viditelná spektroskopie byla vynalezena v roce 1940 vědci Carym a Beckmanem. Od té doby je i nadále jednou z hlavních disciplín v téměř každé analytické laboratoři.

V průběhu desetiletí došlo k četným vylepšením, včetně variabilního řešení štěrbin, potlačení šumu a zapojení elektroniky. Šíření osobních počítačů po roce 1980 vedlo k významnému zlepšení v získávání dat a ovládání přístrojů. Snad nejradikálnější konstrukční změnou se stalo zavedení diodového pole spektrofotometru Hewlett-Packard. Na rozdíl od tradičního skenování monochromátorů s jediným fotonásobičem se nový spektrometr sestával z fotonásobiče, který umožňoval souvislou sadu měření v rámci sekund.

V roce 1990 byl představen systém optických vláken s vysokou kvantovou účinností a 100 krát nižším šumem. [17]

2.2 Princip UV/VIS spektrofotometrie

Podstatou ultrafialové a viditelné spektrometrie je absorpce ultrafialového a viditelného záření (200 – 800 nm) prošlého absorbujícím vzorkem. Fotony z ultrafialové nebo viditelné oblasti spektra mají totiž dostatečnou energii pro excitaci valenčních elektronů při absorpci záření.

Vnitřní energie molekuly je dána součtem tří druhů energií: elektronové, vibrační a rotační. Tyto energie nabývají jen určitých hodnot odpovídajících hladinám energie, přičemž největších hodnot energií dosahují mezi základní a elektronovou hladinou. Mezi energiemi sousedních vibračních a energiemi rotačních hladin je rozdíl menší.

Absorpcí fotonu přijme molekula energii, která vede k přechodu elektronu na excitovanou hladinu a molekula přejde na jednu z mnoha vibračních a rotačních hladin. Takto probíhá absorpce fotonů jen o málo se lišících energií a vytváří tak velmi blízké absorpční čáry, které splývají v pásy. Výsledkem UV/VIS spektroskopie jsou tedy pásová spektra, která jsou tvořena závislostí absorbance na vlnové délce.

Každá průhledná látka většinou absorbuje některé oblasti elektromagnetického záření, roztoky některých látek jsou zbarvené a absorbují světlo určitých vlnových délek viditelného spektra.

Výstupem je spektrum, které je grafickým zobrazením funkční závislosti energie, většinou vyjádřené v procentech transmitance (T), nebo jednotkách absorpance (A), na vlnové délce dopadajícího záření. [11, 15]

2.2.1 Spektrální oblasti

Označení	λ	Absorbující látky
Vzdálená ultrafialová oblast (far UV) – vakuová oblast	< 190 nm	nasyčené sloučeniny monoenuové sloučeniny
Blízká ultrafialová oblast (near UV)	190 – 380 nm	polynenasycené a aromatické sloučeniny
Viditelná oblast (VIS)	380 – 780 nm	barevné látky

Tab. 3. Přehled spektrálních oblastí

2.2.2 Komplementarita barev

λ (nm)	Barva absorbovaného světla	Barva absorbující látky
400 - 435	fialová	žlutozelená
435 - 480	modrá	žlutá
480 - 490	zelenomodrá	oranžová
490 - 500	modrozelená	červenooranžová
500 - 560	zelená	purpurová
560 - 580	zelenožlutá	fialová
580 - 595	žlutooranžová	modrá
595 - 620	červenooranžová	zelenomodrá
620 - 760	červená	modrozelená

Tab. 4. Komplementarita barev

2.3 Základní vztahy a Lambert – Beerův zákon

UV/VIS paprsek o známé vlnové délce a intenzitě označujeme jako zářivý tok Φ_0 . Ten prochází absorpčním zářením (vzorkem), při tom je ochuzen o odražené, rozptýlené a absorbované záření. Rozhodující část úbytku záření připadá na jeho absorpci (odraz a rozptyl zanedbáváme). Relativní část prošlého záření popisuje tzv. transmitance T .

$$T = \frac{\Phi}{\Phi_0} (\times 100\%)$$

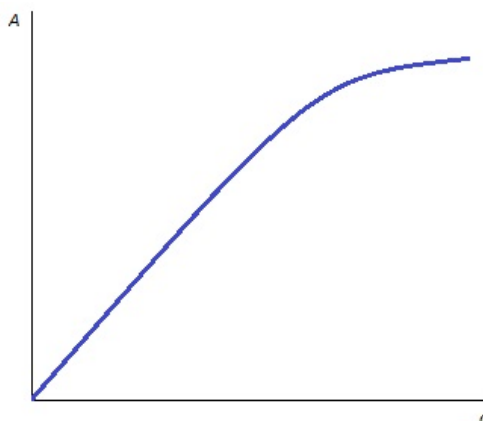
Φ dopadající zářivý tok

Φ_0 prošlý zářivý tok

Pro samotné měření je zásadním parametrem absorbance, která představuje záporný dekadický logaritmus transmitance, a proto klesá se stoupající transmitancí. S rostoucí absorpcí záření roste absorbance. Blíží-li se transmitance nule, blíží se absorbance nekonečnu.

$$A = -\log T = \log \frac{\Phi_0}{\Phi}$$

Samotný Lambert – Beerův zákon popisuje linearitu míry absorbovaného záření a koncentraci absorbující látky ve vzorku. Platí však jen do určité míry, od určité koncentrace přestává tato linearita platit, tak přestává platit i Lambert – Beerův zákon. UV/VIS spektroskopie je tak určena pro ředěné vzorky.



Obr. 4. Rozsah Lambert – Beerova zákona a závislost absorbance na koncentraci.

Přesný popis Lambert – Beerova zákona definuje absorbanci jako součin koncentrace, tloušťky absorpční vrstvy a molárního absorpčního koeficientu absorbující látky. [11, 15]

$$A = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot l$$

ε_{λ}	molární absorpční koeficient látky při vlnové délce ($dm^3 \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)
c	látková koncentrace dané látky ve vzorku ($mol \cdot dm^3$)
l	tloušťka absorbující vrstvy (cm)

Pokud je v látce obsaženo více absorbujících látek, celková absorbance je sumou absorbancí jednotlivých látek dle vztahu:

$$A = A_1 + A_2 + \dots + A_0$$

2.4 Instrumentace

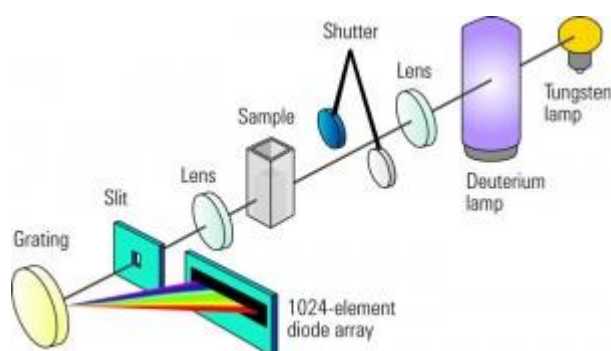
2.4.1 Obecné schéma UV/VIS spektrofotometru

Přístroj pro UV/VIS spektroskopii může být buď jednopaprskový, kdy je měření nutno provádět 2x. Jako první se měří slepý vzorek, který se poté vymění za zkoumanou látku. V dnešní době se však více používá přístroj dvouprskový, kdy se slepý i měřený vzorek měří zároveň, paprsky jsou rozděleny sadou zrcadel.

Jako materiál pro kyvety se nejčastěji používá sklo a plasty, které však neabsorbují pro vlnové délky pod 300 nm, tam se pak používá křemenné sklo.

Řada látek má pak charakteristické spektrum. U směsí látek je touto metodou skoro nemožné určit složení, tedy provést kvalitativní analýzu.

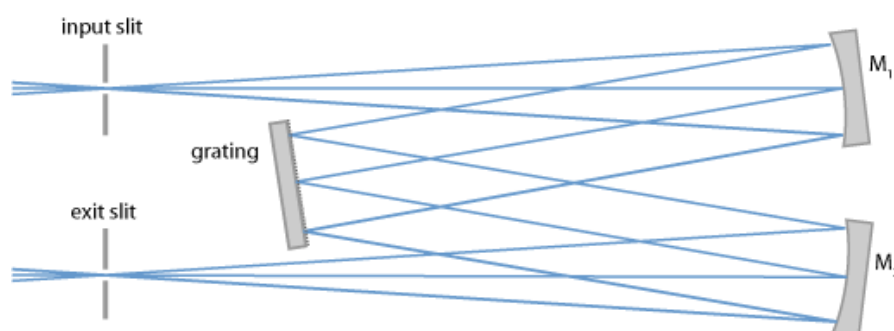
Jako vhodná rozpouštědla se používají nejčastěji acetonitril, voda, methanol, ethanol, diethylether, glycerol, dichlormethan, chloroform, ethylacetát, atd. Rozpouštědlo volíme v závislosti na spodní mezi vlnové délky jejich absorbance. [11, 15]



Obr. 5. Základní schéma UV/VIS spektrofotometrie

UV/VIS spektrofotometr se skládá z těchto částí:

- Zdroj záření: jako zdroje záření se používají dvě různé lampy produkující spojité záření o rozsahu vlnových délek přibližně 160 až 3000 nm.
 - Wolframová žárovka (Tungsten lamp): využívána pro rozsah vlnových délek 350 – 3000 nm. Je značně citlivá ke změnám napětí, proto musí být napětí dobře stabilizováno.
 - Deuteriová lampa (Deuterium lamp): zdroj pro ultrafialovou oblast záření. Elektricky excitovaný vodík nebo deuterium při nízkém tlaku produkují kontinuální ultrafialové spektrum. Oblast rozsahu záření 160-375 nm. Pro toto záření se používá křemenná kyveta, protože sklo záření pod 350 nm absorbuje.
- Monochromátor: zařízení, které soustavou posuvných zrcadel a štěrbin v mřížce vytváří ze spojitého záření svítící lampy monochromatické záření (o velmi malém rozsahu vlnových délek. Nejčastěji se používá konstrukce Czerny–Turner).



Obr. 6: Schéma monochromátoru Czerny-Turner

- Sada zrcadel: monochromatické zařízení je zde rozděleno do dvou stejných paprsků. První paprsek prochází referenční kyvetou, druhý kyvetou se vzorkem.
- Detektor záření – fotonásobič: z rozdílu absorbancí se určuje reálná absorbance vzorku

Výsledkem jsou absorpční spektra. Podle srovnání tvarů a absorpčních maxim těchto pásových spekter vzorku a standardu lze určit látky obsažené ve vzorku. V případě ultrafialových a viditelných spekter jde však o doplňkovou identifikační metodu, protože v případě směsi látek ve vzorku dochází ke skládání spekter,

navíc výsledná spektra jsou jednoduchá a poskytují pro identifikaci látky omezené množství informací. Tímto způsobem ale můžeme získat podklady, které vhodně doplňují informace z měření infračervených spekter, NMR a hmotnostních spekter.

Kvantitativní analýza probíhá nejčastěji metodou kalibrační křivky. Z měření kalibračních roztoků standardu o známých koncentracích v oblasti platnosti Lambert-Beerova zákona získáme kalibrační křivku, jejímž porovnáním provádíme kvantitativní měření. Toto měření znesnadňuje více látek ve směsi. [11, 15]

3 Stanovení pomocí Folin – Ciocalteuova činidla

3.1 Folin-Ciocalteuovo činidlo

3.1.1 Historie objevu činidla

Metoda stanovení fenolických látek pomocí Folin-Ciocalteuova činidla je jedna z běžně používaných metod známá přibližně 100 let. Byla vyvinuta švédsko-americkým chemikem O. T. O. Folinem a jeho kolegy na Harvardské univerzitě. Sloužila ke studiu metabolismu proteinů u lidí.

V prvotní fázi bylo činidlo nazýváno jako Folin - Denisovo a bylo připraveno smícháním wolframanu sodného a kyseliny fosfomolybdenové v kyselině fosforečné, poté povařeno po dobu 2 hodin, ochlazeno, zředěno a filtrováno. Tato metoda byla následně použita pro stanovení fenolických látek v moči, kdy se k činidlu přidal síran lithný a brom na konci doby varu. Přidání lithia totiž zabraňuje tvorbě sraženiny. Výsledné reakční činidlo, známé už jako Folin-Ciocalteuovo se stalo známým činidlem pro určení obsahu fenolických látek z široké škály zdrojů. [21]

V minulosti byly zkoušeny různé kombinace koncentrace uhličitanu a reakční teploty k úpravě snížení doby zabarvení roztoků. Při teplotě 40 °C byla sice reakční doba rychlejší, nicméně termolabilita fenolických sloučenin způsobila naměření nižších hodnot.

Jako standard se začala používat kyselina gallová a místo roztoku uhličitanu hydroxid sodný. Při této metodě dochází k redukci již po 3 minutách. Oxidace fenolických sloučenin probíhá tím rychleji, čím je zásaditější prostředí, proto je nutná alkalizace. [24]

Studie ukázaly, že reaktivita Folin – Ciocalteuova činidla není omezena pouze na fenoly. I mnoho dalších sloučenin reaguje spolu s Folin Ciocalteuovým činidlem. [22]

3.1.2 Charakteristika činidla

Folin-Ciocalteuovo činidlo je sloučenina neobsahující fenolickou skupinu. Reakcí s fenoly a nefenolickými látkami poskytuje tzv. chromogeny, které mohou být detekovány jak spektrofotometricky, tak v chromatografických metodách použity jako rozprašovací činidla.

Jedná se o zářivě žlutou čirou kapalinu, kterou je možné skladovat těsně uzavřenou po omezenou dobu při pokojové teplotě. Činidlo může být ředěno deionizovanou vodou. [22, 24]

Připravuje se rozpouštěním množství wolframanu a molybdenanu sodného ve vodě. Po přidání 85% kyseliny fosforečné, koncentrované kyseliny chlorovodíkové, síranu litného a kapalného bromu vznikají šestimocné komplexy – fosfomolybdenové či fosfowolframové kyseliny. Zbarvení roztoku je způsobeno přenosem elektronů k zásaditému pH a redukcí komplexů fosfomolybdenové/fosfowolframové kyseliny. [4]

3.2 Princip stanovení fenolických látek při použití Folin-Ciocalteuova činidla

Způsob stanovení pomocí Folin-Ciocalteuova činidla je velmi rozšířený a běžně používaný v laboratořích, podrobnosti provedení metody se ale značně liší.

Principem stanovení je oxidace fenolických látek v alkalickém prostředí, přičemž se barva látek v přítomnosti fenolů mění ze žlutého zbarvení fosfowolframové heteropolykyseliny na modré komplexy fosfomolybdenové/fosfowolframové kyseliny vzniklé redukcí. Modré pigmenty pak mají maximální absorpci při 765 nm. Výzkumy se ale zabývají možnou závislostí na kvalitativním nebo kvantitativním složení směsi fenolů, dále na pH roztoku (ta se nejčastěji upravuje přidáním uhličitanu sodného). [4]

4 Předchozí výzkumy v této oblasti

4.1 Antioxidační aktivita a fenolické sloučeniny v 32 vybraných rostlinách (2007)

Wojdyło (2007) zakládá tento výzkum na faktu, že byliny se používají v řadě odvětví, včetně medicíny, výživy, nápojů, barvení, repelentů, vůní a kosmetiky. Mnoho druhů bylin má léčivé vlastnosti s příznivým vlivem na zdraví. Zejména ho zajímala však antioxidační aktivita, protizánětlivé, antimikrobiální, antimutagenní a antikarcinogenní efekty. Autor zde poukazuje na fakt, že rozsáhlé studie biologicky aktivních látek a jejich celkového obsahu byly provedeny, avšak fenolické identifikační údaje jsou stále nedostatečné a neúplné.

Celkový obsah fenolických látek byl za použití Folin – Ciocalteuova činidla a kvalitativní a kvantitativní analýza hlavních fenolických látek byla provedena pomocí HPLC. Jako standard byla použita kyselina gallová. [23]

4.2 Vliv celkového množství fenolických látek na antioxidační kapacitu obilovin (2009)

Výzkum Zorica Hodzice a kol. autorů z European Journal of Scientific Research z roku 2009 v oblasti preventivní medicíny ukazuje, že funkční výživa hraje klíčovou roli ve snižování rizikových faktorů některých chronických onemocnění a navazuje na články z devadesátých let. Cílem této studie bylo porovnat celkové množství fenolických látek a antioxidační aktivitu s ním související. Obsah fenolických látek byl stanoven pomocí Folin – Ciocalteuova činidla.

Absorbance výsledné modré barvy byla v tomto případě měřena při vlnové délce 760 nm po 60-ti minutách. Jako standard byla použita kyselina gallová.

Výsledky této studie ukazují významnou korelaci mezi koncentrací fenolických sloučenin a antioxidační kapacitou extraktů obilí. Celkové výsledky 476 vzorků ukázaly, že největší antioxidační sílu, stejně jako největší množství fenolických látek obsahuje pohanka. [6]

4.3 Celkový obsah fenolických látek v okrasných kultivarech *Origanum vulgare* (2009)

Výzkum Neugebauerové z Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity Brno se zaměřil na stanovení celkového obsahu fenolických látek v rodu dobromysl spektrofotometricky pomocí Folin – Ciocalteuova činidla. Tento taxon byl zvolen zejména díky významnosti antioxidační aktivity fenolických látek u těchto druhů léčivých a kořeninových rostlin. Obsah polyfenolů byl stanoven jako ekvivalenty kyseliny gallové. Absorbance paralelních vzorků byla měřena při vlnové délce 765 nm.

Výstupem tohoto výstupu bylo poté porovnání výsledků celkového obsahu fenolických látek v hodnocených vzorcích. Výsledky ukázaly, že množství fenolických látek se tvoří nezávisle na původu sklizených vzorků. [16]

5 Jiné metody stanovení obsahu fenolických látek

Rostlinné potraviny (včetně ovoce, obilnin, luštěnin a zeleniny) a nápoje (včetně čaje, kávy, ovocné šťávy a kaka) jsou hlavními zdroji fenolických látek v lidské stravě. Příprava a extrakce fenolových sloučenin z této široké škály vzorků závisí hlavně na povaze matrice vzorku a chemických vlastností fenolických sloučenin.

Pevné látky musejí projít homogenizací, přičemž se perforuje jejich plazmatická membrána a buněčný obsah se uvolní do prostředí. K tomu se využívá různých metod, nejčastěji ultrazvuk, protlačení buněk malým otvorem, použití detergentu anebo rozbití buněk rotačním pístem. Následuje izolace pomocí extrakce vhodným činidlem.

Kompletní extrakce fenolických sloučenin je důležitým krokem při přípravě vzorku. Samotnou extrakci ovlivňuje mnoho parametrů ovlivňujících výtěžek fenolických látek. Do nich patří zejména doba extrakce, teplota, typ rozpouštědla a počet opakovaných extrakcí vzorku. [9]

5.1 Extrakce látek z různých typů matric

Extrakce je proces, při kterém dochází k oddělení analytu od ostatních složek. Při separaci jsou v kontaktu dvě nemísitelné fáze, mezi které se rozdělují analyty na základě rozdílných rozpustností v jednotlivých rozpouštědlech. Rozlišujeme několik druhů extrakcí fenolických látek. [13]

5.1.1 Obecné rozdělení typů extrakcí

5.1.1.1 Podle způsobu provedení

Do této skupiny se řadí jednostupňové, mnohostupňové či kontinuální metody. Při jednostupňových dochází k ustanovení jedné rovnováhy mezi fázemi, provádí se nejčastěji roztřepání v dělicí nálevce. Mezi mnohostupňové se řadí extrakce v zařízení podle Craiga (rozdělování na lehčí a těžší fázi a opětovným protřepáváním), nebo mnohonásobné roztřepání v dělicí nálevce. Neustále se dotýkající fáze při protiproudém pohybu se nazývají kontinuální. Provádí se v Soxhletově extraktoru.

5.1.1.2 Podle zúčastněných fází

- Plyn – kapalina (GLE, Gas-Liquid Extraction): těkavé látky jsou extrahovány plynem z kapalného roztoku. Používá se také pro nakoncentrování těkavých složek vzorku při plynové chromatografii.
- Kapalina – kapalina (LLE, Liquid-Liquid Extraction)
- Kapalina – pevná látka (LSE, Liquid-Solid Extraction): Tuhé organické materiály se extrahují za pomoci organického rozpouštědla. Rozpustné anorganické soli se mohou extrahovat z tavenin za pomoci horké vody.

5.1.1.3. Podle charakteru extrahovaných látek

- extrakce organických látek
- extrakce kovových chelátů
- extrakce iontových asociátů

5.1.2 Extrakční metody pro izolaci fenolických látek

5.1.2.1. Extrakce kapalina – pevná látka (LSE, Liquid-Solid Extraction)

Dochází k extrakci analytů z pevného vzorku do roztoku pomocí rozpouštědla. Součástí extrakce je úprava pevných vzorků, do které patří krájení, drcení, mletí, homogenizování, či roztírání pískem. Účelem těchto úprav vzorků je vznik co největší plochy pro extrakci, čímž se usnadňuje průběh extrakce. Výsledkem je roztok jedné či více složek.

5.1.2.2. Extrakce podporovaná mikrovlnným ohřevem (MASE, Microwave Assisted Solvent Extraction)

Při této extrakci je používáno mikrovlnného ohřevu rozpouštědla nebo složek matrice. Doba extrakce je pak závislá na typu a teplotě rozpouštědla. V průběhu extrakce je vzorek zahříván a promícháván. Použití této metody je vhodné pouze pro termostabilní sloučeniny.

5.1.2.3. Zrychlená extrakce rozpouštědlem (ASE, Accelerated Solvent Extraction; PLE, Pressurised Liquid Extraction – kapalinová extrakce podporovaná tlakem)

Jedná se o extrakční metodu pevná látka – kapalina. Je to extrakce trvající přibližně 5 – 15 minut, za použití zvýšené teploty a tlaku. [4]

5.1.2.4. Superkritická fluidní extrakce (SFE, Supercritical Fluid Extraction)

Při tomto typu extrakce se používají tzv. superkritické tekutiny, nejčastěji CO₂ v superkritickém stavu (31°C, 7,3 MPa), kdy má CO₂ vlastnosti kapaliny i plynu, což umožňuje rychlou extrakci (hustotu má blízkou kapalinám – dobré rozpouštěcí vlastnosti, difúzní konstanta blízká plynům – rychlý přesun hmoty). Jedná se o rychlou, cenově nenáročnou a šetrnou metodu.

5.1.2.5. Extrakce ultrazvukem

Dochází k vytváření bublinek páry uvnitř i vně buňky působením ultrazvukových vln na membrány a buněčné stěny. Tím dojde ke zlepšení přechodu extrahované látky ven z buňky a přechodu rozpouštědla dovnitř buňky.

5.1.2.6. Disperze matrice na pevné fázi (Matrix Solid-Phase Dispersion – MSPD)

Tato metoda umožňuje kompletní rozdělení komponent a selektivní vymývání molekul různých skupin sloučenin ze stejného vzorku v jednom kroku. Tato metoda se používá při izolaci léků ve stravě, ale i při analýze herbicidů, znečišťujících látek v živočišných tkáních, ovoci, zelenině, atd.

5.1.2.7. Mikroextrakce pevnou fází (SPME)

Při mikroextrakci pevnou fází jsou používána vlákna z taveného křemene potažená polyakrylátém jako stacionární fází při extrakci analytu z kapalného nebo plynného vzorku, přičemž spotřeba organických rozpouštědel je mnohem menší než u extrakce pevnou fází. Na tuto metodu navazuje např. plynová chromatografie, tenkovrstvá chromatografie nebo HPLC chromatografie.

5.1.2.8. Třepání

Prováděno na třepáčkách. Díky třepání je zajištěn dostatečný kontakt mezi vzorkem a rozpouštědlem a dochází k přechodu hmoty. Dělená látka přechází z pevné do kapalné fáze, což závisí na styčné ploše jednotlivých fází.

5.1.2.9. Působení teploty

Zde se využívá působení různé teploty na směs vzorku a rozpouštědla. Teplo je zde zajišťováno pomocí vodních lázní či zahříváčů, naopak nižší teploty jsou zajišťovány pomocí chladicího zařízení. Principem extrakce za vyšší teploty je zvýšení rychlosti pohybu částic, čímž se zvyšuje pravděpodobnost srážek těchto částic a tedy i rychlost chemické reakce. Při zvýšení teploty o 10°C je rychlost chemických reakcí zvýšena dvou až čtyřnásobně. [14]

5.2 Separační a analytické metody fenolických látek

Pro orientační identifikaci fenolických látek v rostlinách slouží:

- Tenkovrstvá chromatografie (TLC – Thin Layer Chromatography)
- Kolonová chromatografie (CC – Column Chromatography).

Ke kvalitativnímu a kvantitativnímu stanovení se používají:

- Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC – High Performance Liquid Chromatography)
- Plynová chromatografie (GC – Gas Chromatography)
- Kapilární elektroforéza (CE – Capillary Electrophoresis)
- Hmotnostní spektrometrie (MS – Mass Spectrometry)
- Nukleární magnetická rezonance (NMR – Nuclear Magnetic Resonance).

5.2.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie se využívá především k separaci a kvantitativní analýze směsí látek, které jsou netěkavé nebo špatně těkavé a termicky labilní. K separaci využívá různé systémy pevné nebo kapalné stacionární fáze a kapalné mobilní fáze. Podle mechanismu separace se používají rozpouštědla, resp. rozpouštědlové směsi různé polarity, přičemž změna vlastností mobilní fáze je v systému danou stacionární fází hlavním faktorem ovlivňujícím retenci jednotlivých složek směsi a tím i jejich vzájemné rozdělení.

5.2.1.1. HPLC ve spojení s coulometrickým detektorem

Pro stanovení fenolických látek se v posledních letech začalo využívat vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s coulometrickým detektorem. Coulometrická detekce s elektrodovým polem je velmi citlivý způsob detekce, ve které je využita série 4-16 průtočných coulometrických cel, ve kterých dochází k elektrochemické přeměně analytu. Na každou celu je vložen jiný, ale konstantní potenciál a každá látka se oxiduje (redukuje) při jiném potenciálu, ten je pak nazván tzv. dominantním potenciálem.

CoulArray detektor je coulometrický multielektrodový detektor, který byl zkonstruován pro použití v HPLC a který se používá pro detekci elektroaktivních látek. Umožňuje charakterizaci látek na základě poměru odezvy signálu velkého počtu kanálů.

5.2.1.2. HPLC ve spojení se spektrofotometrickým detektorem

Spektrofotometrický detektor je v chromatografii nejvíce rozšířen. Přístroj je vybaven deuteriovou výbojkou a mřížkovým monochromátorem. Může pracovat při volitelné vlnové délce v rozsahu 200-800 nm.

5.2.1.3. HPLC ve spojení s diodovými poli

Detektory diodového pole snímají celé spektrum v reálném čase bez přerušení chromatografické separace. Tyto detektory umožňují detekci látky při jakékoliv zvolené vlnové délce a jejich porovnávání s knihovnou spekter. Tyto detektory slouží k identifikaci látek.

5.2.1.4. HPLC ve spojení s hmotnostním spektrometrem

Hmotnostní spektrometrie je všestranná, rychlá a citlivá metoda, která je často využívána ke kvalitativní i kvantitativní analýze, jelikož významně napomáhá identifikaci, určení struktury organické látky i určení její relativní hmotnosti.

5.2.1.5. Spojení HPLC/MS s ionizací za atmosférického tlaku

Umožňuje práci prakticky bez omezení průtoku a složení mobilní fáze i s možností gradientové eluce.

5.2.2 Tenkovrstvá chromatografie (TLC - Thin Layer Chromatography)

Mimořádně výhodná metoda pro rychlé rozdělení rostlinných a léčivých extraktů, která v současné době stále hraje významnou roli v analýze polyfenolů. Jako stacionární fáze je zde používán SiO₂.

5.2.3 Plynová chromatografie (Gas Chromatography - GC)

Plynová chromatografie byla používána pro analýzu flavonoidů od 60. let 20. století. Je používána zejména pro deriváty flavonoidů, které jsou separovány na koloně naplněné silikonovým polymerem. Jako detektor je zde využíván UR a UV/VIS spektrofotometr.

5.2.4 Kapilární elektroforéza (CE - Capillary Electrophoresis)

Jedná se o separační metodu, která využívá pohybu nabitých částic v elektrickém poli. Podstata metody spočívá v charakteristické rychlosti různých druhů částic, které se pohybují v elektrickém poli uvnitř malé kapiláry.

Touto metodou se stanovuje množství polyfenolů v krevní plazmě s elektrochemickou, fluorescenční nebo hmotnostní detekcí.

5.2.5 Hmotnostní spektrometrie

Metoda založená na určování hmotnosti atomů, molekul [4, 13, 14]

Praktická část

6 Materiál

6.1 Pícniny

Pícninářství je součástí speciální rostlinné produkce. Zabývá se především výrobou kvalitních objemných krmiv z pícnin na orné půdě a trvalých travních porostů. Opatření, které zvyšují produkční schopnost a kvalitu travních porostů, se nazývají pratotechnika. Zahrnuje sečení, ošetření herbicidy, atd.

6.1.1 *Dactylis glomerata* – srha laločnatá

Srha laločnatá (*Dactylis glomerata*) patří spolu s jíllem mnohokvětým a bojínkem lučním k nejvýnosnějším travám. Uplatňuje se v nejrůznorodějších podmínkách. Vyniká velmi příznivou reakcí na hnojení.



Obr. 7. *Dactylis glomerata* – srha laločnatá

V našich klimatických podmínkách je srha plastickým druhem, který se pěstuje v dostatečně vlhkých, písčitohlinitých až hlinitých humózních půdách s pH 6. Nevyhovující jsou extrémně těžké půdy. Na extrémně lehkých a vysychavých půdách dochází ke zvýšení obsahu ligninu a křemíku. Nejvýnosnější je 1. seč srhy. [20]

6.1.2 Silážování

Získaný materiál se přepravuje do silážních prostorů, kde se následně udusává pomocí lisovacích zařízení nebo dusacích válců. Tím se předchází delšímu působení vzduchu na materiál a snižuje se riziko výskytu plísní.

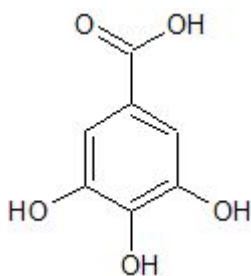
Při silážování hmoty dochází ke vzniku fermentačních procesů, díky kterým se tvoří důležité látky. Zejména kyselina mléčná zabraňuje dalším nežádoucím rozkladným procesům.

Silážuje se studeným způsobem (při teplotách pod 30 °C). Při teplém způsobu silážování se teplota zvyšuje až na 50-60 °C. Druhý způsob se již dnes nepoužívá.

Jako konzervační přípravky se používají kyseliny (HCl, H₂SO₄, kyselina mravenčí, kyselina propionová), bakteriální přípravky nebo soli. [20]

7 Analýza vzorků

Cílem praktické části bylo stanovení celkového množství fenolických látek ve vzorcích pícnin a silážích vybraných odrůd *Dactylis glomerata*. Pro analýzu bylo vybráno celkem 80 vzorků, které byly baleny v papírových sáčcích. Obsah fenolických látek byl pak stanoven spektrofotometricky pomocí Folin-Ciocalteuova činidla jako ekvivalenty kyseliny gallové (GAE).



Obr. 8. Kyselina gallová (GAE)

7.1 Zpracování materiálu pro analýzu

Vycházela jsem ze vzorků deseti odrůd srhy laločnaté, sklizené ve dvou sečích. Součástí analýzy bylo také zkoumání obsahu fenolických látek v silážovaných formách z nich připravených, a to pro každou odrůdu i seč. Tyto siláže byly ošetřeny pomocí různých modifikátorů.

Původní rostliny byly hnojeny dusíkatými hnojivy, ke kterým byl přidáván draslík a fosfor. Siláž byla provedena pomocí silážních aditiv *Microsil premix* a *Kemisile 2000 Plus*. *Microsil premix* obsahuje bakterie mléčného kvašení (*Lactobacillus plantarum*, *L. buchneri* a *Enterococcus faecium*). V *Kemisile 2000 Plus* je to poté kyselina mravenčí, kyselina propionová, kyselina benzoová a mravenčan sodný. V práci se bude jednat i o srovnání v tomto případě biologického (*Microsil premix*) a chemického (*Kemisile 2000 Plus*) ošetřovadla. Ve vzorcích se vyskytovaly i siláže bez ošetření, které fungovaly jako kontrola.

Drtě byly silážovány v silážních nádobách o hmotnosti 6 kg, intenzivně udusávány a zavřeny víkem k zamezení přístupu vzduchu. Takto byly uskladněny při teplotě 28°C po dobu 90 dní. Poté proběhlo hodnocení kvality fermentačního procesu pomocí pH, množství kyseliny mléčné, octové, máselné, obsahu alkoholu a obsahu amoniaku. Informace o vzorcích jsou uvedeny v příložené tabulce.

1. SÉRIE ZH Číslo vzorku						3. SÉRIE - SH					
Odrůda	Seč	Ošetření	Opak	Odrůda	Seč	Ošetření	Opak	Odrůda	Seč	Ošetření	Opak
01.	1/1.	Greenly	1	-	-	01.	53/2	Starly	1	Kemisile	1
02.	1/2.	Greenly	2	-	-	02.	13/3	SW Luxor	1	Kontrola	1
03.	2/1.	Starly	1	-	-	03.	15/3	SW Luxor	1	Microsil	1
04.	2/2.	Starly	2	-	-	04.	17/3	SW Luxor	1	Kemisile	1
05.	3/1.	SW Luxor	1	-	-	05.	1/4	Otello	1	Kontrola	1
06.	3/2.	SW Luxor	2	-	-	06.	3/4	Otello	1	Microsil	1
07.	4/1.	Otello	1	-	-	07.	5/4	Otello	1	Kemisile	1
08.	4/2.	Otello	2	-	-	08.	19/5	Husar	1	Kontrola	1
09.	5/1.	Husar	1	-	-	09.	21/5	Husar	1	Microsil	1
10.	5/2.	Husar	2	-	-	10.	23/5	Husar	1	Kemisile	1
11.	6/1.	Amera	1	-	-	11.	93/1	Greenly	2	Kontrola	1
12.	6/2.	Amera	2	-	-	12.	99/1	Greenly	2	Microsil	1
13.	7/1.	Dika	1	-	-	13.	94/1	Greenly	2	Kemisile	1
14.	7/2.	Dika	2	-	-	14.	69/1	Starly	2	Kontrola	1
15.	8/1.	Bepro	1	-	-	15.	98/1	Starly	2	Microsil	1
16.	8/2.	Bepro	2	-	-	16.	97/1	Starly	2	Kemisile	1
17.	9/1.	Vega	1	-	-	17.	95/1	SW Luxor	2	Kontrola	1
18.	9/2.	Vega	2	-	-	18.	100/1	SW Luxor	2	Microsil	1
19.	10/1.	Dana	1	-	-	19.	96/1	SW Luxor	2	Kemisile	1
20.	10/2.	Dana	2	-	-	20.	84/1	Otello	2	Kontrola	1
2.SÉRIE - SH Číslo vzorku						4.SÉRIE - SH					
Odrůda	Seč	Ošetření	Opak	Odrůda	Seč	Ošetření	Opak	Odrůda	Seč	Ošetření	Opak
01.	7/6.	Amera	1	Kontrola	1	01.	37/1.	Otello	2	Microsil	1
02.	9/6.	Amera	1	Microsil	1	02.	103/1.	Otello	2	Kemisile	1
03.	11/6.	Amera	1	Kemisile	1	03.	74/1.	Husar	2	Kontrola	1
04.	31/7.	Dika	1	Kontrola	1	04.	68/1.	Husar	2	Microsil	1
05.	33/7.	Dika	1	Microsil	1	05.	104/1.	Husar	2	Kemisile	1
06.	35/7.	Dika	1	Kemisile	1	06.	105/1.	Amera	2	Kontrola	1
07.	25/8.	Bepro	1	Kontrola	1	07.	102/1.	Amera	2	Microsil	1
08.	27/8.	Bepro	1	Microsil	1	08.	38/1.	Amera	2	Kemisile	1
09.	29/8.	Bepro	1	Kemisile	1	09.	7K/1.	Dika	2	Kontrola	1
10.	55/9.	Vega	1	Kontrola	1	10.	7B/1.	Dika	2	Microsil	1
11.	57/9.	Vega	1	Microsil	1	11.	7CH/1.	Dika	2	Kemisile	1
12.	59/9.	Vega	1	Kemisile	1	12.	8K/1.	Bepro	2	Kontrola	1
13.	37/10.	Dana	1	Kontrola	1	13.	8B/1.	Bepro	2	Microsil	1
14.	39/10.	Dana	1	Microsil	1	14.	8CH/1.	Bepro	2	Kemisile	1
15.	41/10.	Dana	1	Kemisile	1	15.	9K/1.	Vega	2	Kontrola	1
16.	43/1.	Greenly	1	Kontrola	1	16.	9B/1.	Vega	2	Microsil	1
17.	45/1.	Greenly	1	Microsil	1	17.	9CH/1.	Vega	2	Kemisile	1
18.	47/1.	Greenly	1	Kemisile	1	18.	10K/1.	Dana	2	Kontrola	1
19.	49/2.	Starly	1	Kontrola	1	19.	10B/1.	Dana	2	Microsil	1
20.	51/2.	Starly	1	Microsil	1	20.	10CH/1.	Dana	2	Kemisile	1

Tab. 5. Seznam studovaných vzorků

7.1.1 Chemikálie

- metanol 75%; ≥ 99,9%; Sigma-Aldrich
- Na₂CO₃ 7%; ≥ 99,0%; Sigma-Aldrich
- kyselina gallová; 97,5 – 102,5% (titration); Sigma-Aldrich
- Folin-Ciocalteuovo činidlo (Folin & Ciocalteu's phenol reagent); Sigma-Aldrich
- dH₂O

7.2 Příprava vzorků pro analýzu

7.2.1 Vážení a extrakce vzorků

Pro přípravu vzorků bylo na analytických vahách naváženo vždy stejné množství 0,5 g vzorku (sušená a silážovaná forma *D. glomerata*) do plastových zkumavek. Toto množství bylo poté extrahováno v 10 ml 75% methanolu po dobu 24 hodin v třepačce Heidolph Instruments Reax Multi (Schwabach, SRN). Směs byla poté vložena na 5 min do centrifugy při 1500 otáčkách.

7.2.2 Filtrace vzorků

Filtrace je separační metoda, která umožňuje oddělení pevné látky od kapaliny. Kapalina prochází póry v přepážce, zatímco pevná látka se zachycuje na přepážce, kde tvoří tzv. filtrační koláč.

Vzniklý macerát byl filtrován membránovou filtrací, kdy se vytváří přetlak potřebný k filtraci tlakem na píst injekční stříkačky, na které byl nasazen filtrační nástavec. Filtrát byl zachycen do připravených vialek, ze kterých se odebíral 1 ml tohoto filtrátu do 50 ml zkumavek a doplněn 75% methanolem.

7.2.3 Vlastní příprava vzorků

Do připravených 50 ml odměrných baněk s 1 ml filtrátu bylo přidáno 10 ml destilované vody a 1 ml Folin-Ciocalteuova činidla. Po 5 minutách bylo přidáno 10 ml připraveného 7% Na₂CO₃ a doplněno destilovanou vodou po rysku. Takto připravené vzorky byly ponechány po 90 minut stát.

7.3 Stanovení kalibrační křivky

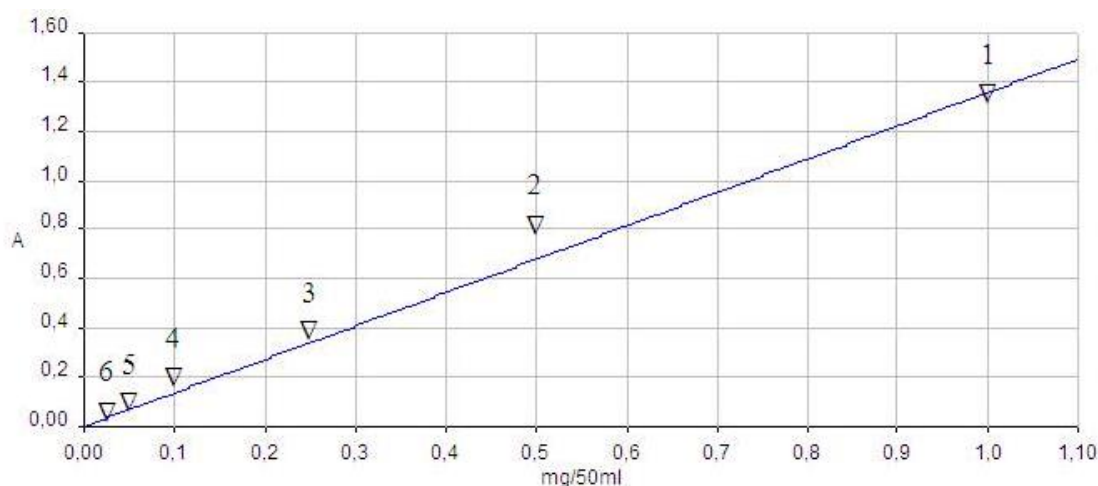
Kyselina gallová byla vybrána jako standardní antioxidační látka, ke které se obvykle vztahují hodnoty celkové antioxidační aktivity. Standardní roztok kyseliny gallové byl připraven rozpuštěním navážky pevného standardu v 75 % methanolu. Zředěné roztoky byly získány postupným ředěním destilovanou vodou (tab. 6.).

<i>Kalibrační roztoky</i>	<i>Koncentrace c [mg/ml]</i>
1.	1
2.	0,5
3.	0,25
4.	0,1
5.	0,05
6.	0,025

Tab. 6. **Koncentrace kalibračních roztoků**

Měrná kyveta obsahovala roztok kyseliny gallové o zadané koncentraci, srovnávací kyveta obsahovala destilovanou vodu. Naměřená data byla zpracována jako závislost absorbance na koncentraci roztoku.

Sledování antioxidační aktivity bylo prováděno pomocí UV/VIS spektrofotometru Lambda 25 od firmy Perkin Elmer (USA). Jedná se o dvoupaprskový spektrofotometr s monochromátorem a fotonásobičem. Měření bylo provedeno v křemenných kyvetách o tloušťce 1 cm. Absorbance vzorků byla měřena při vlnové délce 765 nm. Naměřená data byla posléze vyhodnocena pomocí software UV WinLab a matematicky zpracována programem MS Excel.



Obr. 8. **Příklad kalibrační křivky u jedné sady vzorků měření**

7.4 Stanovení celkového obsahu fenolických látek v několika odrůdách *Dactylis glomerata*

Kvantitativní stanovení obsahu fenolických látek ve vzorcích bylo provedeno spektrofotometricky pomocí UV/VIS spektrofotometru Lambda 25 Perkin Elmer. Celkové množství bylo vypočteno pomocí kalibrační křivky, zjištěné hodnoty byly přepočteny na 100 g hmoty a vyjádřeny v gramech standardu kyseliny gallové.

1. SÉRIE						3. SÉRIE -					
ZH	Číslo vzorku	Hmotnost (mg/100g)	Odrůda	Seč	Ošetření	SH					
01.	1/1.	1,235	Greenly	1	-	01.	53/2	1,483	Starly	1	Kemisile
02.	1/2.	0,877	Greenly	2	-	02.	13/3	1,378	SW Luxor	1	Kontrola
03.	2/1.	1,265	Starly	1	-	03.	15/3	1,213	SW Luxor	1	Microsil
04.	2/2.	1,212	Starly	2	-	04.	17/3	1,294	SW Luxor	1	Kemisile
05.	3/1.	1,222	SW Luxor	1	-	05.	1/4	1,262	Otello	1	Kontrola
06.	3/2.	0,887	SW Luxor	2	-	06.	3/4	1,231	Otello	1	Microsil
07.	4/1.	1,085	Otello	1	-	07.	5/4	1,310	Otello	1	Kemisile
08.	4/2.	0,741	Otello	2	-	08.	19/5	1,198	Husar	1	Kontrola
09.	5/1.	1,089	Husar	1	-	09.	21/5	0,999	Husar	1	Microsil
10.	5/2.	1,095	Husar	2	-	10.	23/5	1,294	Husar	1	Kemisile
11.	6/1.	1,214	Amera	1	-	11.	93/1	1,116	Greenly	2	Kontrola
12.	6/2.	1,035	Amera	2	-	12.	99/1	1,221	Greenly	2	Microsil
13.	7/1.	1,075	Dika	1	-	13.	94/1	1,134	Greenly	2	Kemisile
14.	7/2.	1,029	Dika	2	-	14.	69/1	1,192	Starly	2	Kontrola
15.	8/1.	1,198	Bepro	1	-	15.	98/1	1,181	Starly	2	Microsil
16.	8/2.	1,007	Bepro	2	-	16.	97/1	1,296	Starly	2	Kemisile
17.	9/1.	1,064	Vega	1	-	17.	95/1	1,043	SW Luxor	2	Kontrola
18.	9/2.	1,031	Vega	2	-	18.	100/1	1,040	SW Luxor	2	Microsil
19.	10/1.	1,211	Dana	1	-	19.	96/1	1,035	SW Luxor	2	Kemisile
20.	10/2.	1,073	Dana	2	-	20.	84/1	1,108	Otello	2	Kontrola
2.SÉRIE -						4.SÉRIE -					
SH	Číslo vzorku		Odrůda	Seč	Ošetření	SH					
01.	7/6.	1,330	Amera	1	Kontrola	01.	37/1.	0,967	Otello	2	Microsil
02.	9/6.	1,409	Amera	1	Microsil	02.	103/1.	1,144	Otello	2	Kemisile
03.	11/6.	1,511	Amera	1	Kemisile	03.	74/1.	1,121	Husar	2	Kontrola
04.	31/7.	1,258	Dika	1	Kontrola	04.	68/1.	1,313	Husar	2	Microsil
05.	33/7.	1,216	Dika	1	Microsil	05.	104/1.	1,310	Husar	2	Kemisile
06.	35/7.	1,382	Dika	1	Kemisile	06.	105/1.	1,260	Amera	2	Kontrola
07.	25/8.	1,252	Bepro	1	Kontrola	07.	102/1.	1,254	Amera	2	Microsil
08.	27/8.	1,006	Bepro	1	Microsil	08.	38/1.	1,152	Amera	2	Kemisile
09.	29/8.	1,764	Bepro	1	Kemisile	09.	7K/1.	1,093	Dika	2	Kontrola
10.	55/9.	1,260	Vega	1	Kontrola	10.	7B/1.	1,073	Dika	2	Microsil
11.	57/9.	1,368	Vega	1	Microsil	11.	7CH/1.	1,247	Dika	2	Kemisile
12.	59/9.	1,356	Vega	1	Kemisile	12.	8K/1.	1,095	Bepro	2	Kontrola
13.	37/10.	1,333	Dana	1	Kontrola	13.	8B/1.	1,240	Bepro	2	Microsil
14.	39/10.	1,415	Dana	1	Microsil	14.	8CH/1.	1,250	Bepro	2	Kemisile
15.	41/10.	1,377	Dana	1	Kemisile	15.	9K/1.	1,106	Vega	2	Kontrola
16.	43/1.	1,366	Greenly	1	Kontrola	16.	9B/1.	1,153	Vega	2	Microsil
17.	45/1.	1,321	Greenly	1	Microsil	17.	9CH/1.	1,248	Vega	2	Kemisile
18.	47/1.	1,545	Greenly	1	Kemisile	18.	10K/1.	1,231	Dana	2	Kontrola
19.	49/2.	1,200	Starly	1	Kontrola	19.	10B/1.	1,197	Dana	2	Microsil
20.	51/2.	1,224	Starly	1	Microsil	20.	10CH/1.	1,246	Dana	2	Kemisile

Tab. 7: Výsledky práce

Diskuze

Potraviny rostlinného původu jsou zdrojem mnoha přírodních látek. Již v předchozích výzkumech byla přítomnost fenolických látek v rostlinách dávno prokázána a o jejich účinkách na živé organismy se dlouho jen spekulovalo. Zvýšený zájem o tuto tematiku vznikl až v posledních letech, jelikož jejich biologická aktivita v organismu člověka je v některých případech velmi závažná.

Předmětem výzkumů se staly díky své antioxidační aktivitě, která funguje jako ochrana před reaktivními formami kyslíku, který vzniká v rostlinách v důsledku stresů na ně působících. [2] Zajímavostí do jisté míry je, že běžné manipulace s potravinami, jako např. chlazení, zmrazování a kuchyňské úpravy podstatně obsah biologicky aktivních forem neovlivňují. [24]

Při vyhledávání informací pro tuto práci byl především problém v dostupnosti podkladů. Drtivá většina článků a literatury byla cizojazyčná a vzhledem ke konkrétnosti jednotlivých článků na toto téma, nebylo jednoduché vyhledávání i základních pojmů vždy samozřejmostí. Výzkumy v mateřském jazyce sice existují, pohybují se ale na úrovni bakalářských prací, které jsou v mnoha případech příliš konkrétní.

Při pročítání článků o stanovení fenolických látek přímo Folin-Ciocalteuovým činidlem jsem zavadila o problematiku srovnávání jednotlivých studií mezi sebou. Oblíbenost stanovení touto metodou se sice zvyšuje a článků zabývajících se touto metodou přibývá, nicméně metoda se používá s různými modifikacemi, mění se extrakční rozpouštědla, ale i např. vlnová délka měření. Já jsem při měření vycházela z článku o stanovení celkového obsahu fenolických látek v okrasných kultivarech *Origanum vulgare* [16] která udávala měření při laboratorní teplotě a vlnovou délku 750 nm. Vyšší teploty měření sice výrazně urychlují, nicméně kvalita výsledků klesá. Vlnová délka byla zvolena vzhledem k použití kyseliny gallové jako standardu.

Při procesu stanovení fenolických látek byl zkoumán pouze tento jeden konkrétní typ stanovení. Výhodou stanovení UV/VIS spektrometrie je především jednoduchost a citlivost měření, nachází-li se vzorek ve vhodném prostředí. Nevýhodou mohou být vysoké investiční náklady, např. na koupi standardů a činidel. Existují však i další typy, nebyly však součástí praktické části. Další druhy stanovení, které by mohly být vhodné a jsou ve výzkumech velmi časté, jsou stanovení pomocí chromatografických metod, elektroforézou, nebo pomocí hmotnostního spektrometru. Nevýhodou stanovení fenolických látek metodou UV/VIS za pomoci Folin-Ciocalteuova činidla je to, že můžeme měřit pouze celkový obsah fenolických látek. Určitou nevýhodou je i doba jednoho měření. Výhodou je naopak při vhodných podmínkách jistá reprodukovatelnost, účinnost a bezpečnost. Naproti tomu při stanovení metodou HPLC lze stanovit jednotlivé fenolické látky. Podle výzkumů je však tato metoda méně účinná. [2]

Při stanovení obsahu fenolických látek bylo použito celkem 80 vzorků, z toho dvacet vzorků odrůd *Dactylis glomerata* a 60 vzorků jejich silážovaných hmot, které byly připraveny za použití různých aditiv. Na těchto vzorcích jsem chtěla demonstrovat konkrétnost měření a velkou rozdílnost výsledků při použití různých metod ošetření materiálu. Faktorem sledování byl v tomto případě počet sečení a ošetření sklizené hmoty silážními aditivy.

Samotný výzkum se sestával v drtivé většině ze dvou dnů, přičemž v první den došlo k vážení materiálu na analytických vahách (s přesností na tisíce gramů), přípravě vzorků přidáním 75 % methanolu a následné extrakci, která trvala přesně 24 hodin. V tento den byl připraven i 7 % roztok uhličitanu sodného, který se rovnou připravoval do 1 l odměrné baňky.

Druhý den došlo k samotnému stanovení fenolických látek. Nejdříve byly připraveny kalibrační roztoky standardu kyseliny gallové. Základní roztok byl připraven smícháním bílé krystalické kyseliny gallové se 75 % methanolem. Ostatní roztoky o daných koncentracích byly připraveny ředěním roztoku základního. Z těchto roztoků byl poté odebrán 1 ml a přenesen do 50 ml odměrných baněk. K vzorkům bylo poté přidáno po 10 ml destilované vody a 1 ml svítivě žlutého Folin-Ciocalteuova činidla. Došlo k oxidaci fenolických látek v alkalickém prostředí, přičemž došlo k zelenému zabarvení roztoků, jehož tmavost závisela na zvyšující se koncentraci vzorků. V teoretické části však byla v principu stanovení pomocí tohoto činidla uvedena modrá barva komplexů. Podmínkou tohoto zabarvení však bylo alkalické prostředí, které bylo zajištěno pomocí 7 % uhličitanu sodného, ten byl přidán po 5 minutách od přidání Folin-Ciocalteuova činidla ke vzorkům. Po přidání uhličitanu se čekalo přesně 90 minut na kvalitní průběh reakce. Důvodem požadovaného modrého zabarvení roztoků je jejich maximální absorpce v závislosti na složení fenolů.

Samotné stanovení probíhalo při vlnové délce 765 nm, což je vlnová délka, při které dochází k maximální absorpci modrých pigmentů, které se vytvořily při oxidaci fenolických látek v alkalickém prostředí.

Poté došlo na samotné měření pomocí UV/VIS spektrofotometru Lambda 25. Výsledky byly počítačově zpracovány a byla získána konečná koncentrace. Množství fenolických látek bylo poté přepočteno podle vztahu

$$m = \frac{c \cdot V_p \cdot m_c \cdot V_c}{m_v \cdot V_e}$$

kde m ... hledaná hmotnost, c ...koncentrace získaná z přístroje Lambda 25, V_p ...objem pipetáže, V_c ...celkový objem, m_v ...hmotnost vzorku, V_e ... objem extrakce. Výsledky byly zpracovány v programu MS Excel.

V průběhu výzkumu došlo i na měření jiných materiálů a částí rostlin stejnou metodou stanovení. Toto měření nebylo součástí bakalářské práce a není zde uvedeno. Problémem však bylo, že se reakce nechala proběhnout jen 60 minut. Z výsledků bylo prokázáno, že zkracovat dobu měření příliš vhodné pro další vyhodnocování, protože výsledky ukázaly velkou chybovost. Domnívám se, že důvodem chybnosti byl nedostatečný čas přeměny na množství modrých komplexů, které v reakci vznikají. Absorpce vzorků poté velmi kolísala.

Při porovnávání výsledků celkového obsahu fenolických látek v praktické části bylo zjištěno, že odrůda *Dactylis glomerata* „Starly“, obsahuje nejvíce fenolických látek. Nicméně ve své silážované formě si v 1. i 2. seči prvenství neudržela. Naopak nejméně látek bylo naměřeno v odrůdě „Otello“ ve 2. seči. Obsah látek ale i v tomto případě v silážované formě neodpovídal nejmenšímu množství. Tyto odchylky by mohly vznikat samotným způsobem silážování a ošetření těchto hmot.

Z výsledků je také patrné působení ošetření na silážované hmoty a seče. V první seči v drtivé většině obsah fenolických látek zvyšoval *Kemisile 2000*, obsah byl dokonce vyšší, než při použití aditiv. Přípravek *Microsil premium* výsledek příliš neovlivňoval, nebo slabě snižoval. *Kemisile 2000* je chemický přípravek obsahující např. kyselinu mravenčí a propionovou. V jeho popisku je uveden vliv na snižování pH, udržování aerobní stability, ničení nežádoucí mikroflóry a uchovávání cukrů a zvyšování stravitelnosti. Zejména s posledním bodem výčtu vlastností se shodují i výsledky práce.

V druhé seči naopak nastal zvrat a hodnoty se obrátily. *Microsil premium* ve většině případů celkový obsah látek mírně zvyšoval, nebo nezvyšoval vůbec, *Kemisile 2000* naproti tomu výsledek slabě snižoval, nebo nesnižoval vůbec. Domnívám se, že tyto podmínky mohly být způsobeny odlišným působením ošetření v různých částech roku, klimatickými podmínkami, anebo i předchozí manipulací s materiálem. Naměřené hodnoty u různých vzorků mohly být také významně ovlivněny extrakční metodou a strukturálními vlastnostmi materiálu.

Existuje také mnoho látek, které interferují s látkami fenolické povahy. Ty mohou také ovlivňovat výsledky výzkumů. Jsou jimi např. proteiny, aromatické aminy, redukující látky včetně kyseliny askorbové a některých sacharidů. Měření ovlivňuje i samotný výběr standardu. To je také důvodem, proč články s touto tematikou často nepostačují k publikaci v mnoha předních časopisech. Někteří vědci se totiž domnívají, že je zbytečné stanovovat celkové množství fenolických látek, protože odstranění těch rušivých stojí mnohem více času, činidla, úsilí než při provádění analýzy pomocí HPLC. [24]

V rostlinných materiálech se vyzdvihuje zejména vliv fenolických látek na stravitelnost. Na jednotlivých vzorcích srhy by se dalo usoudit, která odrůda by mohla být vzhledem ke stravitelnosti nejvhodnější. U silážovaných forem by se dala porovnávat účinnost aditiv na jednotlivé odrůdy a z toho vyvodit, která

kombinace by byla nejvhodnější. Práce by se však mohla zařadit mezi ostatní práce popisující stanovení celkového obsahu fenolických látek UV/VIS spektrofotometrií pomocí Folin-Ciocalteuova činidla, protože těchto prací zejména v mateřském jazyce je málo. Pokračování této práce by se mohlo zabývat porovnáváním jednotlivých metod extrakce, izolace a analýzy, zkoumáním látek a podmínek ovlivňujících měření, nebo okolnostmi, které ovlivňují samotný materiál.

Závěr

V teoretické části jsem popsala základní vlastnosti fenolických látek a jejich účinek na živé organismy. V další části jsem z dostupných zdrojů popsala metodu jejich stanovení pomocí UV/VIS spektroskopie, zároveň uvedla její historii, základní vztahy a instrumentaci. Podstatná část byla věnována samotnému Folin-Ciocalteuovu činidlu, ke konci práce jsem ve zkratce popsala téma pícninářství vzhledem k materiálům použitým v praktické části. V té jsem se věnovala stanovení celkového množství fenolických látek v 80 vzorcích sušených a silážovaných hmot *Dactylis glomerata*. V bakalářské práci bylo zpracováno několik cizojazyčných článků a literatury.

Zdroje

[1] BENEŠOVÁ, H. *Změny obsahu volných fenolických látek v listech ječmene jarního aklimovaného na rozdílné UVB radiační podmínky při nízké ozářenosti FAR [online]*. Ostravská univerzita v Ostravě, Ostrava. 2012 [cit. 2015-07-22]. Dostupné z: <http://konference.osu.cz/svk/sbornik2012/pdf/budoucnost/fyzika/Benesova.H.pdf>

[2] DJURDJEVIC, L., MITROVIC, M., PAVLOVIC, P., PERISIC, S. *Total phenolics and phenolic acids content in low (*Chrysopogon gryllus*) and mediocre quality (*Festuca vallesiaca*) forage grasses of Deliblato Sands meadow – pasture communities in Serbia [online]*. Sinisa Stankovic Institute for Biological Research, Belgrade. 2005. p. 54-59, [cit. 2015-07-22]. Dostupné z: <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/52516.pdf>

[3] DOSTÁL, J a kol. *Lékařská chemie II, bioorganická chemie*. Masarykova univerzita, Brno. 2012. 165 s. ISBN: 978-80-210-5538-4

[4] GRYGÁRČÍKOVÁ, J. *Stanovení polyfenolů v netradičních obilovinách Folin-Ciocalteuovou metodou, diplomová práce [online]*. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Zlín. 2012/2013. [cit. 2015-07-22]. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/10563/25076>

[5] HAVLÍKOVÁ, P. *Změny v celkové antioxidační kapacitě séra u depresivní poruchy [online]*. Disertační práce. Brno, 2006 [cit. 2015-07-22]. Dostupné z: is.muni.cz/th/18288/lf_d/Disertacni_prace_Havlikova.doc

[6] HODZIC, Z., PASALIC, H., MEMISEVIC, A. *The Influence of Total Phenols Content on Antioxidant Capacity in the Whole Grain Extracts [online]*. European Journal of Scientific Research, 2009. [cit. 2015-07-22]. Dostupné z: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.335.7023&rep=rep1&type=pdf>

[7] HOSSAIN, M., SHAH, M. *A study on the total phenols content and antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of endemic plant *Merremia borneensis* [online]*. King Saud University – Arabian Journal of Chemistry, Malaysia. 2015, p. 66-71, [cit. 2015-07-22]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535211000116>

[8] KATALINIC, V., MILOS, M., KULISIC, T., JUKIC, M. *Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols [online]*. Faculty of Chemical Technology, Department of Biochemistry and Food Chemistry of University of Split, Split. 2004. 8 p. [cit. 2015-07-22]. Dostupné z: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.317.5114&rep=rep1&type=pdf>

- [9] KHODDAMI, A., WILKES, M., ROBERTS, T. *Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds [online]*. Department of Plant and Food Sciences - University of Sydney, Sydney. 2013. 48 p. [cit. 2015-07-22]. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/18/2/2328>
- [10] KLEJDUS, B. *Separace a identifikace isoflavonů v rostlinném materiálu [online]*. Olomouc, 2004. [cit. 2015-07-22]. Dostupné z: http://www.prf.upol.cz/fileadmin/user_upload/.pdf
- [11] KLOUDA. *Moderní analytické metody*. Pavel Klouda, Ostrava. 2003, 132 s. ISBN 80-863-6907-2.
- [12] KREJČÍKOVÁ, A. *Zajímavé reakce fenolických látek [online]*. Přf UK v Praze, Praha. 2012. 4 s. [cit. 2015-07-22]. Dostupné z: <http://konference.osu.cz/svk/sbornik2012/pdf/budoucnost/didaktika/krejcikova.pdf>
- [13] MARCANÍKOVÁ, K., BEŇOVÁ, B. *Využití coulometrického detektoru pro analýzu fenolických látek [online]*. Chemické listy. 104, 2010, s. 27 - 30. [cit. 2015-07-22]. Dostupné z: http://uch.prf.jcu.cz/MERCK2010/documents/abstrakty/Marcanikova_abstrakt.pdf
- [14] MĚŘÍNSKÁ, R. *Studium fenolických látek ve vybraných biologických materiálech s využitím metody LC/MS [online]*. Ústav chemie potravin a biotechnologií Masarykovy univerzity v Brně, Brno 2008. [cit. 2015-07-22]. Dostupné z: https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=5957
- [15] MUSIL, K. *Laboratorní cvičení z fyzikálně-chemických metod [online]*. Hradec Králové, 2013 [cit. 2015-07-22].
- [16] NEUGEBAUEROVÁ, J., VÁBKOVÁ, J., TEJKLOVÁ, E. *Celkový obsah fenolických látek v okrasných kultivarech *Origanum vulgare* [online]*. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Brno 2009. [cit. 2015-07-22]. Dostupné z: http://tilia.zf.mendelu.cz/ustavy/553/dzi/www/data/1_celk.pdf
- [17] PREVATT, J. *Modern UV-VIS Spectroscopy [online]*. 2015. Dostupné z: http://www.streetdirectory.com/travel_guide/15051/gadgets/modern_uv_vis_spectroscopy.html
- [18] RACEK, J., HOLEČEK, V. *Enzymy a volné radikály [online]*. Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky, Lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Plzeň. 1999. [cit. 2015-07-22]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1999_12_774-780.pdf
- [19] SLANINA, J., TÁBORSKÁ, E. *Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka [online]*. Biochemický ústav, Lékařská fakulta,

Masarykova univerzita v Brně, Brno. 2004. 6 s. [cit. 2015-07-22]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2004_05_02.pdf

[20] ŠANTRŮČEK, J. A KOL. *Základy pícninářství*. AF ČZU, Praha. 2001. 139 s. ISBN: 978-80-213-1605-8

[21] VERMERIS, W., NICHOLSON, R. *Phenolic Compound Biochemistry*. Springer Netherlands of University of Florida, Florida. 2008. 276 p. ISBN: 978-1-4020-5163-0

[22] WANGILA, G. *The Folin-Ciocalteu Assay as a valid means of assessing antioxidant activity of compounds of biomedical interest [online]*. Chemistry and Physics Department of University of Arkansas, Arkansas 2009. [cit. 2015-07-22]. Dostupné z: [BC-05WangilaFolin-Ciocalteureagent.pdf](http://www.chemistry.uark.edu/~wangila/Folin-Ciocalteu.pdf)

[23] WOJDYLO, A. , OSZMIANSKI, J., CZEMERYYS, R. *Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs [online]*. Department of Fruit and Vegetable Processing, Wrocław 2007. [cit. 2015-07-22]. Dostupné z: http://tilia.zf.mendelu.cz/ustavy/553/dzi/www/data/13_anti.pdf

[24] ZLOCH, Z. *Zdravotní efekt polyfenolů z hlediska jejich příjmu a využitelnosti [online]*. Vojenské zdravotnické listy. Ústav hygieny Lékařské fakulty UK v Plzni, Plzeň. 2003. p. 226-230. [cit. 2015-07-22]. Dostupné z: http://www.pmfhk.cz/vzl/vzl5_2003/vzl5_8.pdf

Zdroje obr.:

- Obr. 5. Základní schéma spektrometrie. Dostupné z: http://50.87.149.212/sites/default/files/images/knowledge-base/general/UV_Vis_spectroscopy_1.jpg
- Obr. 6: Schéma monochromátoru Czerny-Turner. Dostupné z: <http://www.rpphotonics.com/spectrometers.html>
- Obr. 7. *Dactylis glomerata* – srha laločnatá. Dostupné z: <http://www.biolib.cz/IMG/GAL/31421.jpg>