



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ  
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ  
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A TECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY  
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

ZMĚNA OBSAHU FENOLICKÝCH KYSELIN  
BĚHEM SLADOVÁNÍ JEČMENE JARNÍHO  
CHANGE OF PHENOLIC ACIDS CONTENT DURING MALTING OF SPRING BARLEY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE  
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE  
AUTHOR

ROMANA ŠTÝBLOVÁ

VEDOUcí PRÁCE  
SUPERVISOR

Ing. SYLVIE BĚLÁKOVÁ, Ph.D.

BRNO 2015



Vysoké učení technické v Brně  
**Fakulta chemická**  
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

## Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0907/2014	Akademický rok: 2014/2015
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Romana Štýblová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie (2901R021)	
Vedoucí práce	Ing. Sylvie Běláková, Ph.D.	
Konzultanti:	RNDr. Mária Veselá, Ph.D.	

### Název bakalářské práce:

Změna obsahu fenolických kyselin během sladování ječmene jarního

### Zadání bakalářské práce:

Cílem bakalářské práce je stanovení obsahu vybraných fenolických kyselin (kávová, vanilová, syringová, p-kumarová, ferulová) ve sladovnické odrůdě ječmene jarního a sledování jejich změn v průběhu výroby sladu.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2015

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

-----  
Romana Štýblová  
Student(ka)

-----  
Ing. Sylvie Běláková, Ph.D.  
Vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
Děkan fakulty

## **Abstrakt**

Tato bakalářská práce se zabývá stanovením vybraných fenolických kyselin (kyselina sinapová, kávová, ferulová, vanillová, syringová, p – hydroxybenzoová a p – kumarová) ve sladovnické odrůdě ječmene jarního a sledováním jejich změn v průběhu výroby sladu v reálném prostředí humnové sladovny.

Teoretická část bakalářské práce je zaměřena na jednotlivé fenolické kyseliny, jejich výskyt v surovinách pro výrobu sladu a metodám jejich stanovení. Podrobně je zde popsána technologie výroby sladu.

V experimentální části bylo odebráno 9 vzorků. Jednalo se o sladovnický ječmen, meziprodukty výroby sladu, slad a sladový květ. Fenolické kyseliny byly ze vzorků extrahovány alkalickou a kyselou hydrolyzou a stanoveny pomocí ultra rychlé kapalinové chromatografie s UV detekcí (UPLC/PDA).

## **Abstract**

This bachelor thesis deals with detection of chosen phenolic acids (sinapic acid, caffeic acid, ferulic acid, syringic acid, p – hydroxybenzoic acid, vanillic acid and p – coumaric acid) in the malting barley and monitoring of their changes during making a malt in real environment of floor malt house.

Theoretical part describes individual phenolic acids, their presentation in raw material for making of malt and methods for determination. There is described technology of making a malt.

The nine samples was taken in experimental part. There were a malting barley, intermediate products of malting, malt and rootlets. Phenolic acids were extracted by alkaline and acid hydrolysis. This samples were detected by Ultra high – performance liquid chromatography using of UV detection (UPLC/PDA).

## **Klíčová slova:**

Fenolické kyseliny, sladovnický ječmen, výroba sladu, slad, UPLC/PDA

## **Keywords**

Phenolic acids, malting barley, manufacture of malt, malt, UPLC/PDA

ŠTÝBLOVÁ, R. *Změna obsahu fenolických kyselin během sladování ječmene jarního*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 43 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Sylvie Běláková, Ph.D..

### **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

Podpis studenta

### *Poděkování:*

*Děkuji vedoucí bakalářské práce Ing. Sylvii Bělákové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, vstřícnost, trpělivost a čas, který mi věnovala při vypracování této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat kolektivu Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského, a.s., v Brně a konzultantce RNDr. Márii Veselé, Ph.D.*

## Obsah

1	Úvod.....	6
2	Teoretická část .....	7
	2.1 Polyfenoly.....	7
	2.1.1 Fenolické kyseliny .....	7
	2.2 Suroviny pro výrobu sladu .....	9
	2.2.1 Ječmen.....	9
	2.2.2 Voda.....	10
	2.3 Výroba sladu.....	11
	2.3.1 Nákup, příjem, čištění, třídění a skladování ječmene .....	11
	2.3.2 Máčení ječmene .....	11
	2.3.3 Klíčení ječmene .....	12
	2.3.3.1 Biologické změny při klíčení .....	12
	2.3.3.2 Technologie klíčení.....	12
	2.3.4 Hvozdění zeleného skladu .....	13
	2.3.5 Druhy vyráběného sladu .....	13
	2.4 Metody stanovení fenolických kyselin .....	14
	2.4.1 Extrakční techniky .....	14
	2.4.1.1 Extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE) .....	14
	2.4.1.2 Extrakce na pevné fázi (SPE) .....	14
	2.4.2 Separální techniky .....	14
	2.4.2.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	15
	2.4.2.1.1 Čerpadla v kapalinové chromatografii .....	15
	2.4.2.1.2 Kolony používané v kapalinové chromatografii .....	16
	2.4.2.1.3 Detektory v HPLC.....	16
	2.4.2.2 Ultra – vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC) .....	16
3	Experimentální část.....	17
	3.1 Přístroje a zařízení .....	17
	3.2 Použité chemikálie.....	17
	3.2.1 Standardy .....	17
	3.2.2 Chemikálie .....	18
	3.3 Podmínky chromatografické analýzy .....	18

3.4	Příprava standardních roztoků .....	19
3.5	Pracovní postup .....	19
3.5.1	Příprava extraktů vzorků ječmene a sladu .....	20
3.5.1.1	Jednoduchá extrakce – volná .....	20
3.5.1.2	Alkalická hydrolýza .....	20
3.5.1.3	Kyselá hydrolýza .....	21
3.5.2	Stanovení retenčních časů jednotlivých fenolických kyselin .....	21
3.5.3	Validace metody .....	21
4	Výsledky a diskuse.....	23
4.1	Kalibrační závislost .....	23
4.2	Stanovení fenolických kyselin.....	24
5	Závěr .....	34
6	Seznam použitých zdrojů .....	35
7	Seznam použitých zkratk a symbolů .....	37
8	Seznam příloh .....	38
9	Přílohy.....	39
9.1	Absorpční spektra jednotlivých fenolických kyselin.....	39
9.2	Vybrané chromatogramy vzorků .....	42

## 1 Úvod

Polyfenoly jsou amorfní látky, které jsou obsaženy v nejrůznějších částech rostliny – v kůře, dřevě, listech, plodech i kořenech [10]. Společným rysem polyfenolů je to, že obsahují jedno nebo více aromatických jader substituovaných hydroxylovými skupinami [28].

Polyfenoly se rozdělují do dvou velkých skupin. První skupinu tvoří flavonoidy, které se dále dělí na flavany, antokyany a flavonoly. Druhou skupinu tvoří fenolické kyseliny. Fenolické kyseliny se dělí na dvě skupiny. První skupinu tvoří deriváty kyseliny benzoové, do nichž se řadí kyselina salicylová, gentisová, p – hydroxybenzoová, vanillová, syringová a další. Druhá skupina je tvořena deriváty kyseliny skořicové, ke kterým patří kyselina ferulová, p – kumarová, kávová a sinapová [28].

U fenolových sloučenin v ječmeni je známé, že mají antioxidační a antiradikálové vlastnosti [13]. Další vlastnosti, které se polyfenolům přisuzují, jsou regulace krevního tlaku a hladiny krevní glukosy. Dále chrání před aterosklerózou a zvyšují rezistenci LDL proti oxidaci [29].

Polyfenolové látky se do piva dostávají prostřednictvím dvou základních surovin, a to ječmene (sladu) a chmele [16]. Tyto látky mají vliv na antioxidační aktivitu a senzorickou stabilitu piva [11]. Asi 80 % fenolových sloučenin pochází ze sladu a zbývajících 20 % přichází s chmelem [13].

Cílem této bakalářské práce bylo stanovit obsah volných, vázaných a esterifikovaných fenolických kyselin v průběhu sladování v reálném prostředí humnové sladovny. Fenolické kyseliny byly vyextrahovány z meziproductů výroby sladu alkalickou i kyselou hydrolyzou a poté analyzovány pomocí ultra rychlé kapalínové chromatografie s UV detekcí při vlnových délkách 280 nm a 330 nm.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Polyfenoly

Polyfenoly tvoří široká skupina látek s různou molekulovou hmotností a rozdílnými fyzikálně – chemickými vlastnostmi. Vyskytují se v ječmeni a sladu, kde pozitivně i negativně ovlivňují kvalitu sladu i samotného piva. V ječmeni se množství těchto látek pohybuje kolem 0,1 – 0,6 % sušiny [5].

Hlavními polyfenoly, které se nachází v ječmeni, jsou fenolické kyseliny, barevné a bezbarvé flavonoidy, kondenzované a další polymerní polyfenoly, kumariny a ubichinony [1][20].

Polyfenoly mají při výrobě sladu a piva velký význam. Mezi pozitivní význam v kvalitě piva patří antioxidační účinky polyfenolových sloučenin, které mají původ v ječmeni nebo ve sladu a chmelu. Tyto látky mají buď přímou antioxidační aktivitu, nebo působí jako lapače radikálů. Tím zpomalují stárnutí piva a tvorbu nebiologických zákalů [8]. Antioxidační vlastnosti polyfenolů závisí na jejich fyzikálně – chemických vlastnostech, především korelují s obsahem volných hydroxylových skupin [3]. Díky tomu je důležitý obsah polyfenolů v ječmeni a ve sladu s redukčními účinky, které se zachovávají až do hotového piva. Další pozitivní vlastností je spoluúčast polyfenolů s dusíkatými látkami a polysacharidy na plnosti chuti piva [5].

Negativní význam mají polyfenoly, které mají v průběhu sladování tendenci oxidovat nebo kondenzovat. Díky tomu mění fyzikálně – chemické vlastnosti sladu a piva. S tímto jevem se můžeme setkat i u přibarvování piva [6]. Tyto negativní účinky způsobují látky, které se nazývají anthokyanogeny [14].

#### 2.1.1 Fenolické kyseliny

Fenolické kyseliny jsou látky, které obsahují jedno nebo více benzenových jader substituovaných hydroxylovými skupinami. Fenolické látky se řadí mezi látky s antioxidačními vlastnostmi, tedy látky, které mají schopnost vychytávat volné radikály. Díky těmto vlastnostem mají schopnost chránit před mnoha druhy onemocnění jako je např.: kardiovaskulární onemocnění nebo různé druhy rakoviny [8], snižují hladinu cholesterolu v krevním séru a játrech a zvyšují životaschopnost spermií [9].

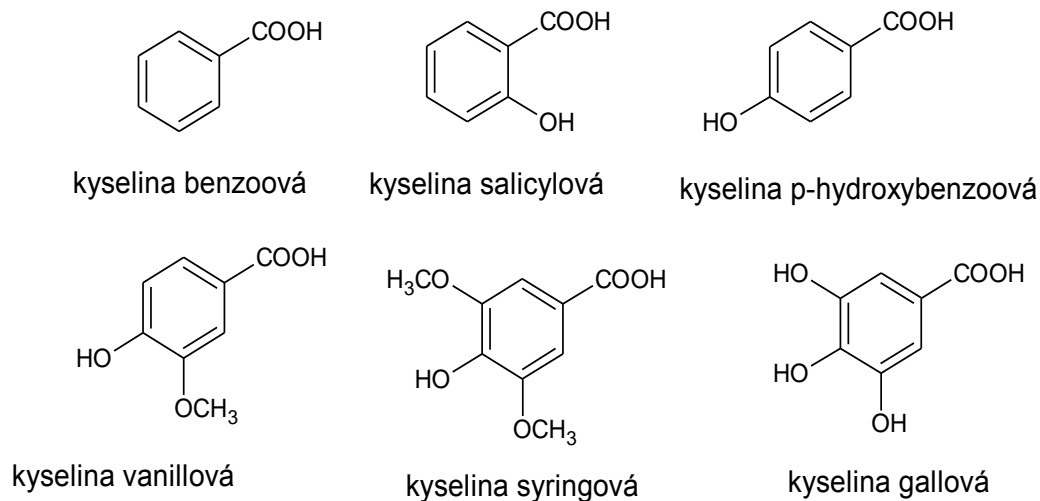
Fenolické kyseliny se hojně vyskytují v rostlinách. Pro člověka jsou esenciální a člověk je musí přijímat ve formě jídla [8].

Fenolické kyseliny se dělí do dvou velkých skupin. První skupinu tvoří deriváty kyseliny benzoové, kam se řadí kyselina salicylová, gentisová, p – hydroxybenzoová, gallová, vanillová, syringová a další. Druhou skupinu tvoří deriváty kyseliny skořicové, kam patří kyseliny p – kumarová, kávová, ferulová, sinapová a další [9].

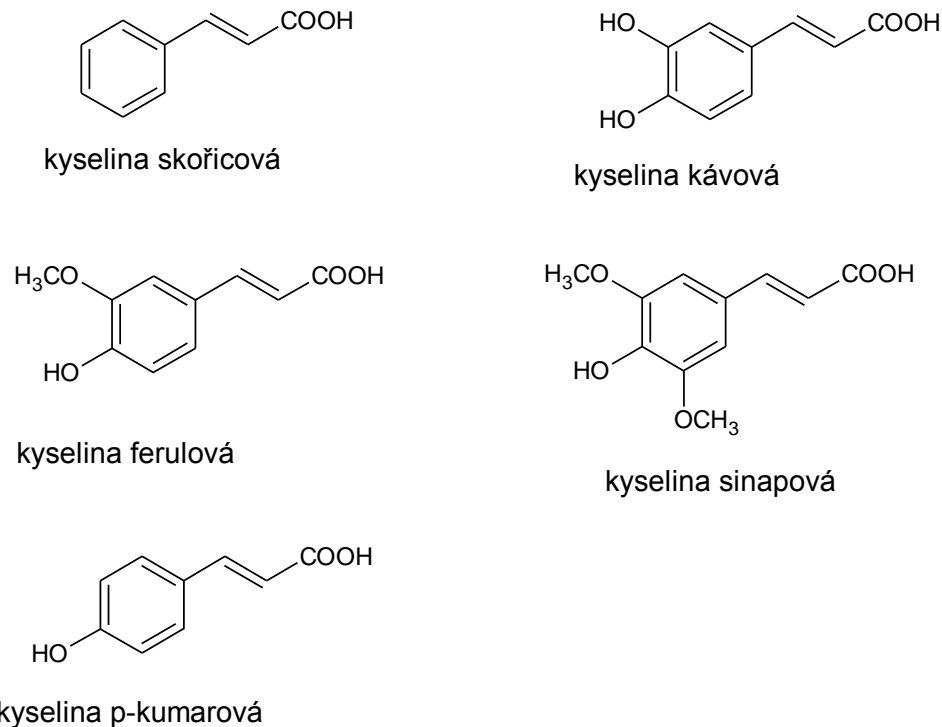
Kyselina ferulová patří k nejčastěji se vyskytujícím fenolickým kyselinám v ječmeni. V nesladovaném zrně ječmene se vyskytuje v množství od 220 do 624 mg·kg<sup>-1</sup> [7]. Další



kyselinou, která je více zastoupená, je kyselina p – kumarová. Fenolické kyseliny jsou v ječné obilce přítomné ve volné a hlavně ve vázané formě jako glykosidy nebo estery nebo jako rozpustné konjugáty [5]. Tyto kyseliny nalezneme v zrna ječmene a v průběhu sladování se jejich obsah zvyšuje až dvojnásobně [13][12].



Obrázek 1 Strukturní vzorec kyseliny benzoové a vybraných derivátů této kyseliny[20]



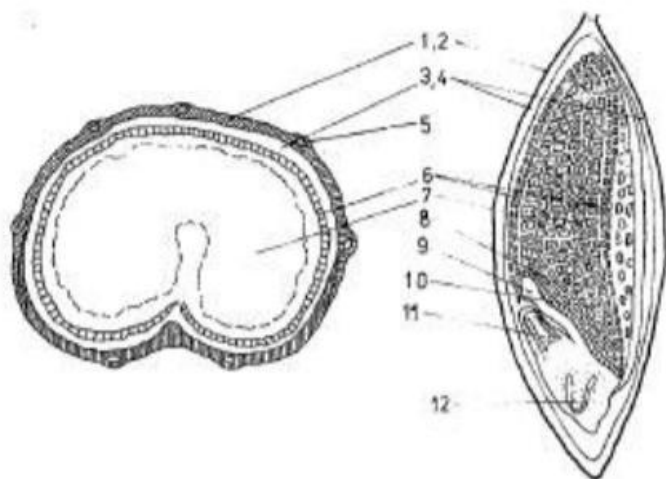
Obrázek 2 Strukturní vzorec kyseliny skořicové a vybraných derivátů této kyseliny [20]

## 2.2 Suroviny pro výrobu sladu

### 2.2.1 Ječmen

Ječmen je jedna z nejrozšířenějších obilovin na světě. Pěstuje se téměř na všech kontinentech. Z hlediska botanického se ječmen řadí do říše rostlin, oddělení semenných, pododdělení krytosemenných, třídy jednoděložných a čeledi lipnicovité. Dále se ječmen může dělit podle způsobu růstu na ječmen planý a ječmen setý. Pro účely sladovnické se dělí na sladovnický (patří sem ječmeny nící) a nesladovnický ječmen. Tato práce se zabývá především o sladovnický ječmen [15][27].

Rostlina ječmene se skládá z několika hlavních částí: kořenové soustavy, stébla, listů, květu a obilky. Jako jeden z mála vytváří ječmen největší soustavu zárodečných kořínků (4 – 10). Stéblo je složeno ze 4 – 8 článků oddělených koleny. Stéblo dosahuje výšky 80 – 130 cm. Uspořádání stébla je takové, že nejmenší článek je naspod a postupně délka stébla dorůstá. Pro zemědělské zpracování ječmene jsou zřejmě jedny z nejdůležitějších částí ječmene listy, jelikož výnos plodů je závislý na velikosti plochy listů. Podle květenství má ječmen složený klas. Obilka neboli plod se skládá z 3 částí: obalu, zárodku a endospermu [15].



Obrázek 3: Příčný a podélný řez ječmenem – Obal: 1 – hřbetní plucha, 2 – břišní plucha, 3 – oplodí, 4 – osemení, 5 – nervové svazky Endosperm: 6 – aleuronové buňky, 7 – škrobové buňky, 8 – prázdné buňky Zárodek: 9 – štítek, 10 – sací epitel, 11 – pochva štítková, 12 – pochva kořínková [14]

Obilka ječmene se skládá z 80 – 88 % sušiny a 12 – 20 % vody. Ve složení ječmene převažují organické látky nad anorganickými. Přítomnost minerálních látek má vliv na růst rostliny. Dalším možným faktorem ovlivňující přítomnost anorganických látek jsou podmínky pěstování. I když se anorganické látky nachází v menším množství, mají důležitý význam jako regulátor biosyntézy vysokomolekulárních látek. Významnou skupinu anorganických látek tvoří také stopové prvky jako je Mn, Cu a B, které ovlivňují funkci enzymů [15].

Sacharidy tvoří zhruba 80 % hmotnosti ječného zrna. Nejvíce zastoupenou skupinou sacharidů je škrob. Škrob je reverzním polysacharidem a zásobárnou živin rostliny v průběhu klíčení. Vzniká enzymatickými reakcemi při fotosyntéze. Ve zralém zrně se nachází výlučně v endospermu, ale není rozmístěn pravidelně. Většina ječmenných škrobů se skládá ze dvou hlavních složek amylosy a amylopektinu [15][23].

Mezi další důležité látky patří dusíkaté látky, podle jejich umístění se dá rozeznat, jestli se jedná o ječmen sladovnický či krmný. Sladovnický ječmen se od ječmene planého liší vyšší akumulací dusíkatých látek v průběhu vegetativního růstu (odnožování a sloupkování) v pletivech. Krmný nebo planý ječmen hromadí dusíkaté látky v sušíně nadzemní části zejména v období kvetení a mléčné zralosti. Rozhodujícími ukazateli, zda bude ječmen zařazen mezi sladovnický, jsou klíčivost a energie klíčení. Čím více ječmen klíčí, tím je lepší kvalita sladu a naopak. Pokud má ječmen nízkou klíčivost, projeví se to na kvalitě sladu – nevyklíčená zrna se nedají zpracovat. Dalším ukazatelem je i rychlost klíčení. Ve sladovnickém ječmeni se nemohou nacházet nečistoty. Velikost zrna by měla být jednotná kvůli přijímání vody při máčení a stejně i při klíčení. Opačný případ by nebyl efektivní. Všechny tyto kvalifikace se dají shrnout do pojmu odrůdové čistoty ječmene. Pokud máme "jednotný ječmen", tedy čistou odrůdu, lépe se zpracovává než směs [15].

Enzymy hrají důležitou roli při výrobě sladu a piva. Z chemického hlediska se enzymy řadí mezi bílkovinné makromolekuly, které dokážou katalyzovat chemické reakce. Mezi molekulou substrátu a enzymem se vytváří tzv. komplex enzym – substrát. Vazby, kterými jsou substráty a další molekuly k enzymům vázány, jsou nekovalentní a odpovídají vazbám uvnitř molekul proteinů [23].

Rychlost enzymových reakcí může být ovlivněna řadou fyzikálně – chemických faktorů. Mezi tyto faktory se řadí teplota, pH, iontová síla roztoku, složení tlumivých roztoků a další. Enzymy jsou klasifikovány do 6 tříd: oxidoreduktasy, transferasy, hydrolasy, lyasy, isomerasy a ligasy [23].

**Oxidoreduktasy** hrají významnou roli při dozrávání, skladování a klíčení ječmene. Zúčastňují se v metabolismu sacharidů, dusíkatých, lipidických látek a na oxidačně – redukčních procesech v dýchacím řetězci. Ovlivňují obsah polyfenolů, barvu sladiny a piva a koloidní senzorkou stabilitu piva. **Transferasy** jsou důležité při dozrávání ječmene, v období posklizňového klidu a při klíčení. Působí v metabolismu sacharidů, dusíkatých, lipidických a ostatních látek ječného zrna. **Hydrolasy** jsou důležitou třídou enzymů jak z hlediska sladařského, tak z hlediska pivovarského. **Lyasy** se podílejí na metabolismu uhlíku, dusíku, polyfenolů a dalších látek. Obdobné uplatnění jako lyasy mají i **isomerasy**. **Ligasy** ječmene a sladu jsou důležité enzymy při biosyntéze škrobu, bílkovin, aminokyselin. Velký význam mají v růstovém procesu při klíčení ječmene, tvorbě kořínků a stříšky [15].

### 2.2.2 Voda

Voda je nejen jednou z důležitých surovin sladu, ale i piva samotného. Pro pivovarské účely se používá varní voda. Varní voda je jednou ze základních surovin pro výrobu piva a její

složení má vliv na konečnou kvalitu produktu. Hlavními složkami varní vody, které ovlivňují kvalitu varní vody, jsou ionty [15][27].

## **2.3 Výroba sladu**

### **2.3.1 Nákup, příjem, čištění, třídění a skladování ječmene**

Prvním krokem při zpracování sladu je nákup ječmene. Zrno ječmene vykupují sladovny buď přímo od pěstitelů ječmene, nebo od obchodních organizací. Po dobu nákupu je nutné provádět rozbory ječmene. Průběžná kontrola je potřebná z více důvodů. Jeden z nejdůležitějších je ten, že ječmen může mít přebytečnou vláhu a bude potřebovat speciální ošetření. Druhým důvodem je zařazení do jakosti ječmene [15].

Po nákupu jsou zrna přijímána a tříděna. Zrna ječmene se třídí podle velikosti. Toto třídění má velký technologický význam v dalším zpracování ječmene. Pokud jsou zrna stejně velká, získáme při klíčení a máčení ječmene homogenní slad. Zrna třídíme do dvou jakostních skupin. Do první třídy řadíme zrna s velikostí nad 2,5 mm. Druhá třída je tvořena zrny o velikosti 2,2 – 2,5 mm [15].

V průběhu skladování ječmene musíme brát ohled na několik faktorů, které by mohly ohrozit kvalitu skladovaného ječmene. Těmito faktory jsou obsah vody, teplota zrna, stupeň poškození obilky, kvalita čištění a třídění a přítomnost škůdců. Jednou z důležitých činností, která je nutná provádět v průběhu skladování, je větrání. Větráním zabráníme vlhnutí ječmene a tím i působením mikroorganismů. Ekonomicky výhodným větráním je tzv. aktivní větrání, při kterém se nepřemisťuje zrno, ale provádí se výměna vzduchu v mezizrnných prostorech [15].

Napadení ječmene škůdci předejdeme především udržováním čistoty. Pokud je ječmen již napaden škůdci, je nutné použít dezinfekční prostředky. Rozeznáváme 3 druhy prostředků – fyzikální, chemické a biologické [15].

### **2.3.2 Máčení ječmene**

Cílem máčení je zvýšit řízeným způsobem obsah vody v zrně pro zahájení enzymatických reakcí a pro klíčení zrna, při únosné spotřebě vody odstranit splavky a lehké nečistoty, umýt zrno a ze zrna vyloužit nežádoucí látky. Technologicky významným efektem je praní ječmene, kdy se z ječmene vylouží nežádoucí látky jako je kyselina křemičitá a bílkoviny z pluch. Tyto látky výrazně ovlivňují senzorické vlastnosti piva a sladu (způsobují hořkou chuť a zákal piva). Podmínkou toho, aby ječmen správně vyklíčil, je dostatek vody a vzduchu u namáčeného ječmene. Samotné máčení ječmene probíhá v náduvnících [15].

K máčení se používá voda. Voda vniká do zrna především embryem. Příjem vody je ovlivněn mnoha faktory. Důležitým faktorem je teplota vody. Čím je voda teplejší, tím rychleji probíhá příjem vody. Závisí také na druhu vody. Voda pro máčení by neměla být tvrdá. Dalším faktorem je velikost zrna ječmene. Lépe a rychleji přijímají vodu menší zrna než zrna velká. Neposledním faktorem je struktura zrna nebo citlivost zrna na vodu. Zrna ječmene nejlépe klíčí při obsahu vody 37–40 % [15].

Máčení se provádí různými způsoby. V současné době se nejvíce využívá vzdušného máčení. Tento způsob se skládá ze tří namáčení. Prvním máčením se zvýší obsah vody v zrně na 30 %. Probíhá zhruba 2 – 4 hodiny pod vodou a potom následuje vzdušná přestávka, která trvá 14 – 20 hodin. Druhé namočení zvýší obsah vody v zrně na 38 – 40 % (6 – 10 hodin.). Opět následuje vzdušná přestávka, která je nezbytná k obeschnutí ječmene. Třetí namočení zvýší obsah vody v zrně ječmene na 42 – 44 % (4 – 6 hod) [15].

### 2.3.3 Klíčení ječmene

#### 2.3.3.1 *Biologické změny při klíčení*

Klíčení je proces, který následuje po máčení. Při klíčení probíhají biologické přeměny ječmene. Zvyšuje se obsah a aktivita enzymů. Množství enzymů je závislé na mnoha faktorech, zejména na odrůdě ječmene, obsahu vody v zeleném sladu, a na teplotě (čím vyšší teplota, tím vyšší je tvorba enzymů). Vysokomolekulární látky se štěpí na nízkomolekulární. Další enzymy se spotřebovávají na tvorbu zárodku a výstavby nových buněk – kořínků a klíčků. Při klíčení se snižuje obsah škrobu a zvyšuje se obsah cukrů, což je způsobeno růstem embrya [15].

Při samotném klíčení rozeznáváme následující stádia: Mokrý hromada, suchá, oschlá hromada, pukavka, mladík, vyrovnaná hromada, stará hromada. **Mokrou hromadu** tvoří ječmen vymočený na humna nebo do klíčidel. **Suchá oschlá hromada** je stadium do 24 h, po vymočení se objevuje první zárodečný kořínek, hromada vyžaduje přívod vzduchu. Ve stádiu **pukavky** hromada vyžaduje dostatek vzduchu. V tomto stádiu se objevují další kořínky a pokračuje jejich růst. V této fázi je slad cítit po okurkách. Po stádiu pukavka následuje stadium **mladík**, což je nejdůležitější fáze klíčení. V tomto stádiu zrno intenzivně dýchá a probíhají enzymatické přeměny. Předposledním stádiem klíčení je **vyrovnaná hromada**. V této fázi je délka kořínků a střílky vyrovnaná a dýchání se zpomaluje. Hromada stárne. Poslední fáze se nazývá **stará hromada**. Hromada se cíleně kypří, aby v ní zůstala určitá koncentrace CO<sub>2</sub>. Závěr klíčení má výrazný vliv na tzv. prodýchání extraktu a na sladovací ztráty [15].

#### 2.3.3.2 *Technologie klíčení*

Před tím, než ječmen poskytne kvalitní slad, musí proběhnout posklizňové dozrávání. Toto dozrávání trvá zhruba 6 až 8 týdnů a ovlivňuje ho počasí během zrání ječmene. Důležité je také chemické složení ječmene. Pokud ječmen obsahuje velké množství dusíkatých látek, tak se špatně luští [15].

Vymočený ječmen má většinou nižší obsah vody, než by potřeboval pro klíčení. V pneumatických sladovnách se obsah vody drží kolem 42 % a v humnových sladovnách zhruba kolem 44 %. Obsah vody musí být v souladu s teplotou klíčení a dobou klíčení [15].

Rozeznáváme dva základní druhy sladoven – klasické a moderní. Mezi klasické sladovny se řadí humnová sladovna, která je použita i pro přípravu našich vzorků ječmene. Vlastností

těchto sladoven je značná tepelná setrvačnost. Do druhé skupiny sladoven patří sladovny bubnové, skříňové nebo věžové [15].

#### **2.3.4 Hvozdění zeleného skladu**

Poslední fází při výrobě sladu je hvozdění. Samotné hvozdění probíhá ve dvou hlavních fázích. V první fázi probíhá předsoušení sladu. Toto předsoušení je rozdílné podle toho, jaký druh sladu chceme vyrobit. Pokud chceme vyrobit světlý slad, sníží se obsah vody u předsoušení ze 40 – 45 % na 10 – 12 % do tzv. proslápnuté lísky. U těchto typů sladů by měla být teplota vstupujícího vzduchu max. 55 °C [15].

Při druhé fázi se postupně zvyšuje teplota a dotahuje se slad. U hvozdění je tato fáze důležitá, neboť se při ní tvoří aromatické a barevné látky, které jsou charakteristické podle druhu sladu. V této fázi se odsouší vázaná vlhkost ze zrna [15].

V průběhu hvozdění dochází jak k chemickým tak k fyzikálním změnám. Mezi fyzikální změny patří snížení obsahu vody, zvětšení objemu, změny objemové hmotnosti a hmotnosti 1000 zrn a v neposlední řadě zvýšení barvy. Mezi chemické změny patří již dříve zmiňované zastavení enzymatických reakcí v zrně a tvorbě barevných a aromatických látek – melanoidinů, které určují charakter sladu [15].

#### **2.3.5 Druhy vyráběného sladu**

V České republice se setkáváme zejména se dvěma druhy sladu: sladem světlého druhu (plzeňského typu) a se sladem bavorského druhu. Přechodem mezi světlými a tmavými slady je slad vídeňský [5].

Světlý slad se používá pro výrobu světlých piv. Je charakterizován příznivým extraktem a dostatečnou enzymatickou silou s nízkou barvou. Pro snadné zpracování ve varně je nutné dokonalé zcukření rmutu, snadné scezení sladiny a nízká barva po vaření. U tohoto typu sladu se omezuje nadměrnému vzniku barevných a aromatických sloučenin, které při hvozdění obecně vznikají. Musí se též uchovat enzymová aktivita a křehkost sladu. Toho se docílí co nejrychlejším snížením obsahu vody v zeleném sladě vysokým tahem vzduchu ventilátorem na 10 – 12 % při teplotách do 55 °C. Slad se vyhřívá pozvolna a dotažení sladu probíhá při maximální teplotě 85 °C. Obsah vody se pohybuje kolem 4 % [5].

Bavorský slad je charakteristický vysokou barvou a výraznějším aromatem. Ječmen pro výrobu tohoto sladu je klíčen o 1 – 2 dny déle s vyšším obsahem vody a při vyšší teplotě. Je odlišně hvozděn, s cílem podpořit tvorbu melanoidinů a je dotahován až při teplotách 105 °C. Obsah vody se pohybuje kolem 2 % [15]. Tyto slady se používají pro přípravu tmavých piv. Mají zejména vyšší hodnoty barvy kongresní sladiny, vyšší obsah bílkovin, nižší extraktivnost a aktivitu enzymů, výrazné aroma a zvýšené koncentrace produktů Maillardovy reakce [1].

Vídeňský slad je přechodným typem mezi světlými a tmavými slady. Má asi dvakrát vyšší hodnotu barvy než světlý plzeňský slad. V současnosti se tento slad příliš nevyrábí. Dříve

se používal pro zvýšení sytosti barvy světlého piva, dnes se používá pro výrobu určitých speciálních piv [5].

## **2.4 Metody stanovení fenolických kyselin**

Nízká hladina polyfenolových látek v analyzovaném materiálu často vyžaduje provedení vhodné extrakce vedoucí k získání zakonzentrovaného podílu analyzovaných látek s redukováným obsahem interferujících příměsí [26].

### **2.4.1 Extrakční techniky**

Extrakce se řadí mezi separační techniky, které jsou založeny na rozpouštění kapalné nebo pevné směsi v kapalině, která se s nimi může mísit jen omezeně. Účelem této metody je rozdělit součásti původní směsi [24].

Z hlediska provedení se dají jednotlivé metody extrakce rozdělit do dvou následujících skupin: LLE (Liquid – liquid extraction – extrakce z kapaliny do kapaliny) a SPE (solid phase extraction – extrakce na pevné fázi) [26].

#### **2.4.1.1 Extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE)**

Extrakce látek z vodných roztoků je důležitou základní operací při práci v organické laboratoři. Tento typ extrakce je založen na přechodu rozpuštěné látky z jedné kapalně fáze do druhé. Může být použita buď k získání požadované látky z roztoku, nebo k odstranění nežádoucí nečistoty z rozpouštědla [25].

Tradičními běžně používanými rozpouštědly jsou horká voda, ethanol, methanol, aceton a ethylacetát, který se vyskytuje nejčastěji. Vzácněji jsou používána jiná rozpouštědla např.: acetonitril, DMF (dimethylformamid) a chloroform. Extrakce je z důvodu dosažení maximálního výtěžku často prováděna za nepřístupu světla, kyslíku, s přidavkem umělých antioxidantů [26].

#### **2.4.1.2 Extrakce na pevné fázi (SPE)**

K tomuto druhu extrakce se nejčastěji používá chromatografických náplňových kolon s řadou adsorpčních materiálů, jako jsou polyamidové materiály, PVPP, Sephadex, modifikovaný silikagel, mikrokrytalická celulóza a další. S extrakčním krokem analýzy zde bývá často spojeno i přečištění analytu, případně frakcionace jednotlivých skupin polyfenolových látek [26].

### **2.4.2 Separační techniky**

Analytickým metodám pro stanovení jednotlivých polyfenolových látek dominuje HPLC (High Performance Liquid Chromatography – vysokoúčinná kapalinová chromatografie) na reverzní fázi s detekcí UV – VIS nebo hmotnostní detekcí. Staršími možnostmi jsou kapilární plynová chromatografie (GC), papírová chromatografie (PC), chromatografie na tenké vrstvě (TLC) a podobně [26].

### **2.4.2.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)**

Chromatografie je separační metoda, založená na rozdílné distribuci dělených látek ve směsi mezi dvě různé nemísitelné fáze. Pohyblivá fáze se nazývá mobilní a nepohyblivou fází nazýváme stacionární. V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina. Stacionární fáze je potom tvořena buď tuhou látkou, nebo kapalinou ukotvenou na tuhém nosiči. U kapalinové chromatografie je mobilní fáze přiváděna do systému pomocí čerpadla za vysokého tlaku [17].

Aby byla umožněna distribuce mezi stacionární a mobilní fází, musí existovat fázové rozhraní. Při dělení látek pak dochází k opakovanému ustalování rovnováhy dělených látek mezi mobilní a stacionární fází. U kapalinové chromatografie záleží na tom, jak velkou afinitu k jaké fázi má separovaná složka. Pokud chová složka větší afinitu ke stacionární fázi, tím rychleji je unášena mobilní fází k detektoru a tím je rychleji detekována. Složka je analyzována detektorem, kde je převedena do podoby chromatografického záznamu, který je nazýván chromatogram [17].

Jsme schopni rozeznat dva druhy elučních sil, které závisí na mobilní fázi. Pokud je mobilní fáze po celou dobu analýzy stejná, jedná se o isokratickou eluci. Pokud se poměr mobilní fáze v průběhu analýzy mění, jedná se o gradientovou eluci. Na tom, jakou eluci použijeme, závisí na tom, jaké fyzikálně – chemické vlastnosti mají složky směsi, kterou separujeme. Pokud mají podobné vlastnosti, použijeme isokratickou eluci. Dále rozeznáváme dvojce uspořádání fází, podle toho zda je mobilní fáze polární či nepolární. Pokud je mobilní fáze polární a stacionární fáze nepolární, jedná se o systém s reverzním uspořádáním. Pokud jsou tyto dvě fáze opačné, jedná se o systém s normálními fázemi [17][19].

#### **2.4.2.1.1 Čerpadla v kapalinové chromatografii**

Čerpadlo má v chromatografu za úkol zajistit stabilní průtok mobilní fáze, jinak jsou kvantitativní výsledky nepřesné, retenční časy kolísají a úroveň šumu pro některé detektory se zvyšuje. V dnešní době se používá několik druhů čerpadel [17].

Jedním z používaných čerpadel je vysokotlaké čerpadlo. Toto čerpadlo může být rozděleno do dvou skupin podle toho, zda pracuje při konstantním tlaku nebo konstantním objemovém průtoku. Oba typy pracují na principu vytlačování mobilní fáze ze zásobníku pístem nebo membránou. Rozdíl je ve způsobu dosažení pohybu pístu čerpadla. U čerpadel, která pracují s konstantním tlakem, se využívá tlak plynu nebo hydraulické kapaliny na píst čerpadla. Čerpadla pracující s konstantním objemovým průtokem využívají k pohybu pístu mechanický pohon [17].

Vhodným typem čerpadel pro kapalinovou chromatografii jsou čerpadla injekčního typu. Tato čerpadla jsou čerpadla, v nichž je tlak na píst vyvíjen speciálním krokovým elektromotorem. Píst je s elektromotorem propojen táhlem se závitem a převodovkou, která zajišťuje rychlý zpětný chod pístu při plnění pracovního válce mobilní fází. Pracovní objem činné části je 100 – 500 ml. Maximální tlak u těchto čerpadel činí 40 – 60 MPa. Průtok mobilní fáze kolonou je konstantní a to i při změně odporu kolony [17].



#### 2.4.2.1.2 Kolony používané v kapalinové chromatografii

V dnešní době se pro analytické účely využívají kolony o vnitřních průměrech 2,1 až 5 mm a délce 10 až 300 mm a plněné náplněmi o velikosti částic 1 až 10  $\mu\text{m}$ . V dnešní době jsou kolony pro aplikace HPLC připravovány výhradně komerčně a uživatel si může maximálně zvolit druh sorbentu a jejich zrnění. Jako druh sorbentu se nejčastěji využívá silikagel či alumina [17].

#### 2.4.2.1.3 Detektory v HPLC

Detektory slouží v chromatografii k detekci separovaných látek. Tyto detektory jsou umístěny za chromatografickou kolonou. Detektory můžeme rozdělit na detektory koncentrační a hmotnostní. Koncentrační detektory reagují na změnu hmotnostní koncentrace složky a hmotnostní detektory reagují na změnu hmotnostního toku složky [17].

Mezi jedny z nejčastěji využívaných detektorů jsou detektory spektrofotometrické. Tyto detektory jsou založeny na principu absorpce záření v oblasti vlnových délek od 190 do 800 nm. Kvantitativní vyhodnocení je založeno na Lambert – Beerově zákoně. Podle konstrukčního uspořádání mohou spektrofotometrické detektory být rozděleny na 4 skupiny:

- a) **Detektory s fixní vlnovou délkou** (nejčastěji 253,7 nm), které používají jako zdroje záření nízkotlakou rtuťovou výbojku.
- b) **Detektory s neměnitelnou vlnovou délkou**, kde jsou předem dané vlnové délky.
- c) **Detektory s programovatelnou vlnovou délkou**, které lze nastavovat v určitém rozmezí. Tato vlnová délka je měnitelná během analýzy. Tyto detektory mají tu nevýhodu, že mají nižší citlivost ve srovnání s detektory s fixní vlnovou délkou.
- d) **Detektory s diodovým polem**, které snímají celé spektrum v reálném čase bez přerušení chromatografické separace. Záření ze zdroje po průchodu měrnou celou detektoru je spektrálně rozkládáno holografickou mřížkou, takže na každou z fotodiód dopadá zářivý tok o určité vlnové délce zeslabený absorpcí v cele detektoru [17].

#### 2.4.2.2 Ultra – vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC)

Tato chromatografie je založená na principu vysokoúčinné kapalinové chromatografii, kde je pro zvýšení účinnosti separace využíváno částic menších než 2  $\mu\text{m}$ . Na rozdíl od kapalinové chromatografie, která pracuje při 30 –40 MPa, UHPLC pracuje při tlacích 100 MPa a více. Pro to, aby byl systém UHPLC schopen dobře pracovat, musí být splněny tyto požadavky:

- Robustní čerpadlo a dávkovací systém
- Rychlé dávkovací cykly
- Přesné dávkování velmi malých objemů
- Co nejmenší zpoždění gradientu
- Vysoká frekvence sběru dat (> 20 Hz, často až 80 Hz)
- Minimální mimokolonové objemy
- Vhodné stacionární fáze (mechanická stabilita při vysokých tlacích, částice menší než 2  $\mu\text{m}$ ) [21][22]

- Kolony v UHPLC mají délku 50 – 150 mm a vnitřní průměr se pohybuje kolem 2,1 mm. Velikost používaných částic se pohybuje od 1,5 do 2,0  $\mu\text{m}$  [17].

### 3 Experimentální část

#### 3.1 Přístroje a zařízení

Separace fenolických kyselin byla provedena na kapalinovém chromatografu ve spojení s PDA detektorem.

K analýze byly použity přístroje a zařízení:

*Tabulka 1 Používané přístroje použité při analýze fenolických kyselin*

<b>Přístroje:</b>	<b>Firma:</b>
Kapalinový chromatograf	UPLC ACQUITY WATERS
Detektor diodového pole	ACQUITY PDA detector
Centrifuga	Sigma 2 – 16 – KC
pH metr	Mettlertoledo, Merci
vakuová odparka	RV 10 digital IKA
Váhy	Mettlertoledo

#### 3.2 Použité chemikálie

##### 3.2.1 Standardy

Pro přípravu kalibračních roztoků byly použity standardy jednotlivých kyselin, které jsou popsány v tabulce níže. Všechny tyto látky byly dodány od firmy Sigma – Aldrich.

*Tabulka 2: Použité standardy kyselin*

<b>kyselina</b>	<b>čistota</b>
p – hydroxybenzoová	>99%
vanillová	>97%
kávová	>98%
syringová	>95%
p – kumarová	>98%
ferulová	>99%
sinapová	>98%

### 3.2.2 Chemikálie

Tabulka 3 Použité chemikálie při přípravě jednotlivých vzorků k analýze fenolických kyselin

Chemikálie:	Firma:	Čistota:
deionizovaná voda	–	–
kyselina mravenčí	LachNer (ČR)	98 %
methanol for HPLC	Sigma Aldrich (ČR)	>99,9 %
n – hexan	Sigma Aldrich (ČR)	> 97 %
aceton	Sigma Aldrich (ČR)	>99,5 %
kyselina chlorovodíková	LachNer (ČR)	>99,5 %
diethyleteher	LachNer (ČR)	98,86 %
ethylacetát	Fluka (Sigma Aldrich) (ČR)	–
hydroxid sodný	ML chemica (ČR)	98 %
EDTA	Sigma Aldrich	> 98,5 %
kyselina askorbová	ML chemica	–

### 3.3 Podmínky chromatografické analýzy

Tabulka 4: Gradient

Čas (min)	Fáze A (%)	Fáze B (%)	Průtok (ml·min <sup>-1</sup> )
0	88,5	11,5	0,3
1	88,5	11,5	0,3
20	68,0	32,0	0,3
22	68,0	32,0	0,3
36	20,0	80,0	0,3
38	88,0	11,5	0,3

**Chromatografická kolona:** Ascentis Express C18 (15 cm x 3,0 mm)

#### Mobilní fáze:

Fáze A: Deionizovaná voda, 0,3% kyselina mravenčí.

Fáze B: Methanol, 0,3% kyselina mravenčí

Průtok: 0,3 ml·min<sup>-1</sup>

Nástřik vzorků: 1 μl

Stanovení bylo prováděno při běžném tlaku, vlhkosti a teplotě v laboratoři.

Spektrofotometrická detekce byla stanovována při vlnových délkách 280 a 330 nm v závislosti na absorpčním maximu jednotlivých fenolických kyselin.

### 3.4 Příprava standardních roztoků

Byly připraveny roztoky jednotlivých fenolických kyselin o koncentraci  $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Z jednotlivých roztoků byl odebrán 1 ml roztoku, které byly smíseny v odměrné baňce o objemu 100 ml. Tímto způsobem byl připraven směsný standard o koncentraci  $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , ze kterého byly postupně odebírány množství k přípravě kalibračních roztoků o koncentracích 20, 10, 8, 4, 2 a  $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Tabulka 5 Potřebné objemy roztoků o koncentraci  $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  pro vytvoření kalibračních roztoků

c [ $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	V [ml]
50	2,5
20	10
10	5
8	4
4	2
2	1
1	0,5

Tabulka 6 Přesné koncentrace jednotlivých fenolových kyselin

kyselina	m [mg]	Rf	c [ $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ]						
			50	20	10	8	4	2	1
p – hydroxybenzoová	26,19	1,05	52,38	20,95	10,45	8,38	4,19	2,09	1,05
vanillová	26,11	1,04	52,22	20,89	10,44	8,36	4,18	2,09	1,04
kávová	25,06	1,00	50,12	20,05	10,02	8,02	4,01	2,01	1,00
syringová	25,32	1,01	50,64	20,26	10,13	8,10	4,05	2,03	1,01
p – kumarová	25,49	1,02	50,98	20,39	10,19	8,16	4,08	2,04	1,02
ferulová	24,73	0,99	49,46	19,78	9,89	7,9	3,96	1,98	0,99
sinapová	25,40	1,02	50,80	20,32	10,16	8,13	4,06	2,03	1,02

### 3.5 Pracovní postup

Vzorky ječmene, meziproduktů výroby sladu a sladu byly odebírány v září roku 2014 v klasické humnové sladovně v Rajhradě. Jejich odebírání a obsah vody ve vzorcích ukazuje Tabulka 7.

Tyto vzorky byly podrobeny extrakci, která byla již dříve popsána v článku od *Karabína* [16]. Jednotlivé kroky extrakce jsou popsány v podkapitolách. Po přípravě vzorků, které jsou popsány níže, byly vzorky podrobeny analýze pomocí UPLC.

Tabulka 7 Odběry jednotlivých meziproduktů sladování

Datum odběru	Označení	Odebraný meziprodukt	Obsah sušiny [%]
21.9.2014	A	Ječmen náduvník	87,70
22.9.2014	B <sub>1</sub>	Ječmen I. Namáčka	72,60
23.9.2014	B <sub>2</sub>	Ječmen II. Namáčka	64,00
24.9.2014	C <sub>1</sub>	Ječmen I. Den klíčení	57,70
25.9.2014	C <sub>2</sub>	Ječmen II. Den klíčení	56,20
27.9.2014	C <sub>3</sub>	Ječmen IV. Den klíčení	53,00
29.9.2014	D	Hvozdění spodní líska	68,20
30.9.2014	E	Slad	94,00
30.9.2014	F	Sladový květ	96,80

### 3.5.1 Příprava extraktů vzorků ječmene a sladu

První krok zahrnoval odtučnění vzorků. 1 g homogenizovaného vzorku byl převeden do plastové centrifugační zkumavky na 50 ml. K tomuto vzorku bylo přidáno 5 ml n – hexanu a vzorek byl třepán 1 min. Suspenze byla oddělena na centrifuze. Tím byl oddělen přebytečný hexan od vzorku. Přebytečný hexan byl pomocí pipety odstraněn. Tato činnost byla opakována dvakrát. Přes noc byly připravené vzorky vysušeny. Vysušené vzorky byly následně extrahovány několikastupňovou hydrolyzou.

#### 3.5.1.1 Jednoduchá extrakce – volná

Vysušený vzorek byl vyextrahován 70% acetonem – třikrát extrakce s 10 ml acetonu. Suspenze byla oddělena v centrifuze. Vodná fáze byla po úpravě pH přelita do 50 ml centrifugační zkumavky. Extrahovaný pevný podíl byl vysušen a podroben alkalické hydrolyze (viz dále).

Vodná organická fáze byla okyselena na pH 2 pomocí kyseliny chlorovodíkové a extrahována pomocí směsi diethylethér:ethylacetát (1:1). Extrakce byla provedena třikrát, vždy s 15 ml směsí. Sesbírané organické vrstvy byly odpařeny na vakuové odparce a vysušeny do sucha. Odparek byl rozpuštěn v 1 ml 20% methanolu. Bylo zkontrolováno pH, aby se pohybovalo kolem hodnoty 2,7. Před analýzou byl vzorek zfiltrován přes nylonový filtr o tloušťce 0,2 µm.

#### 3.5.1.2 Alkalická hydrolyza

Vodná nebo pevná frakce, získaná při přípravě vzorků jednoduché extrakce, byla přenesena do plastové centrifugační zkumavky o objemu 50 ml. Bylo přidáno 10 ml hydroxidu sodného o koncentraci 4 mol.l<sup>-1</sup> s přídatkem EDTA a kyseliny askorbové. Tato směs byla protřepána na třepače po dobu 2 hodin. Po hydrolyze byl vzorek okyselen kyselinou chlorovodíkovou na pH 2 a následně extrahován směsí diethylether:ethylacetát (1:1). Extrakce byla opět prováděna třikrát v 15 ml směsí. Sesbírané organické vrstvy byly odpařeny na vakuové odparce do sucha a poté rozpuštěny v 1 ml 20% methanolu. Vodná fáze zde získaná, byla podrobena kyselé hydrolyze.

### 3.5.1.3 Kyselá hydrolyza

K pevné nebo vodné frakci, získané při alkalické hydrolyze, bylo přidáno 10 ml kyseliny chlorovodíkové o koncentraci  $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Vodná fáze byla nalita do plastové centrifugační zkumavky o objemu 50 ml a bylo k ní přidáno 10 ml kyseliny chlorovodíkové o koncentraci  $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Otevřená zkumavka byla vložena do vodní lázně, kde po dobu 45 minut byla udržována na teplotě  $70 \text{ }^\circ\text{C}$ . Poté byla zkumavka ochlazena na pokojovou teplotu a následně byla třikrát extrahována do směsi diethylether:ethylacetát (1:1). Sbírané organické vrstvy byly odpařeny na vakuové odparce do sucha a poté byly rozpuštěny v 1 ml 20% methanolu.

### 3.5.2 Stanovení retenčních časů jednotlivých fenolických kyselin

Jednotlivé standardy fenolických kyselin byly rozpuštěny a naředěny pomocí methanolu, aby konečná koncentrace vzorků byla  $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Takto připravené vzorky byly proměřeny pomocí kapalinové chromatografie při vlnových délkách 280 a 330 nm. Z chromatogramu byly na základě charakteristických absorpčních spekter každého píku určeny retenční časy jednotlivých fenolických kyselin, které uvádí Tabulka 8.

Tabulka 8: Retenční časy analyzovaných kyselin

Kyselina	Retenční čas [min]
p – hydroxybenzoová	11,08
vanillová	13,73
kávová	14,44
syringová	15,71
p – kumarová	19,93
ferulová	21,87
sinapová	22,50

### 3.5.3 Validace metody

Jednotlivé fenolické kyseliny byly stanoveny vhodnou metodou pomocí UHPLC s PDA detektorem. U všech těchto vzorků byly provedeny vybrané validační parametry, ke kterým v našem případě patří mez detekce a mez stanovitelnosti a linearita.

Mez detekce (LOD) odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu [18].

Mez stanovitelnosti (LOQ) odpovídá koncentraci, při které přesnost a správnost stanovení dovoluje kvantitativní vyhodnocení [18].

Oba dva parametry byly vypočteny z nejnižších koncentrací kalibrační křivky. Nejprve byla změřena výška šumu a poté výšky píků jednotlivých kyselin. Jednotlivé parametry byly potom vypočteny z následujících vzorců:

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot \text{šum}}{b} \quad (1.) [18]$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot \text{šum}}{b} \quad (2.) [18]$$

Kde  $b$  je směrnice kalibrační křivky. Limity detekce a limity stanovení pro jednotlivé kyseliny uvádí Tabulka 9.

Linearita je definována jako schopnost metody poskytnout v daném rozsahu přijatelnou lineární korelaci mezi odezvou detektoru a koncentrací analytu ve vzorku. Linearita v analytické chemii je přímá závislost jedné veličiny (signál) na druhé nezávisle proměnné (koncentrace), kdy hodnota první veličiny je pouze násobkem hodnoty veličiny druhé a případně je k výsledku součinu ještě přičtena konstanta. Převážně se jedná o přímkovou závislost, kdy musí být vhodně zvolen kalibrační model a metoda vyhodnocení linearit [18]. Lineární závislost dvou náhodných proměnných je matematicky vyjádřena obecným vztahem:

$$y = ax + b \quad (3) [18]$$

*Tabulka 9 Parametry kalibračních křivek jednotlivých fenolických kyselin*

<b>Kyselina</b>	$\lambda$ [nm]	$R^2$	<b>Rovnice regresní přímky</b>	<b>LOD [mg·kg<sup>-1</sup>]</b>	<b>LOQ [mg·kg<sup>-1</sup>]</b>
kávová	330	0,996	$y = 33864x - 26882$	0,57	1,91
p – kumarová	330	0,996	$y = 54541x - 53212$	0,70	2,33
ferulová	330	0,996	$y = 28683x - 18715$	0,48	1,61
sinapová	330	0,996	$y = 15308x - 17780$	1,02	3,39
p – hydroxybenzoová	280	0,996	$y = 15170x - 12964$	1,05	3,49
vanilová	280	0,996	$y = 16764x - 11672$	0,86	2,87
syringová	280	0,997	$y = 32587x - 22523$	0,83	1,99

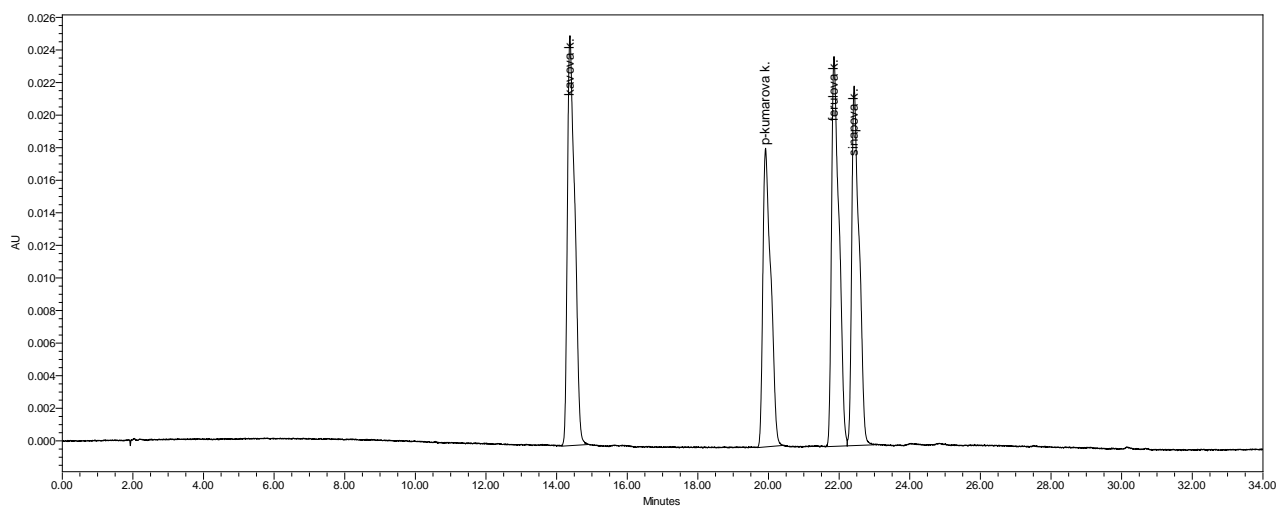
## 4 Výsledky a diskuse

### 4.1 Kalibrační závislost

Kalibrační křivky byly sestaveny pro všechny sledované fenolické kyseliny na sedmi koncentračních hladinách. Postup přípravy je popsán v kapitole 3.4.

Tabulka 10 Data pro vytvoření kalibračních křivek pro kyseliny analyzované při vlnové délce 330 nm

Kyselina kávová		Kyselina p – kumarová		Kyselina ferulová		Kyselina sinapová	
c [mg·l <sup>-1</sup> ]	Plocha píku	c [mg·l <sup>-1</sup> ]	Plocha píku	c [mg·l <sup>-1</sup> ]	Plocha píku	c [mg·l <sup>-1</sup> ]	Plocha píku
1,00	30 270	1,02	53 514	0,99	37 821	1,02	23 786
2,00	53 908	2,04	88 623	1,98	48 585	2,03	25 149
4,01	115 969	4,08	184 632	3,96	99 980	4,06	45 496
8,02	238 673	8,16	377 733	7,91	200 644	8,13	95 684
10,02	299 014	10,20	474 470	9,89	249 904	10,16	123 906
20,05	609 113	20,39	960 276	19,78	508 709	20,32	264 057
50,12	1 689 662	50,98	2 771 188	49,46	1 418 799	50,80	775 014

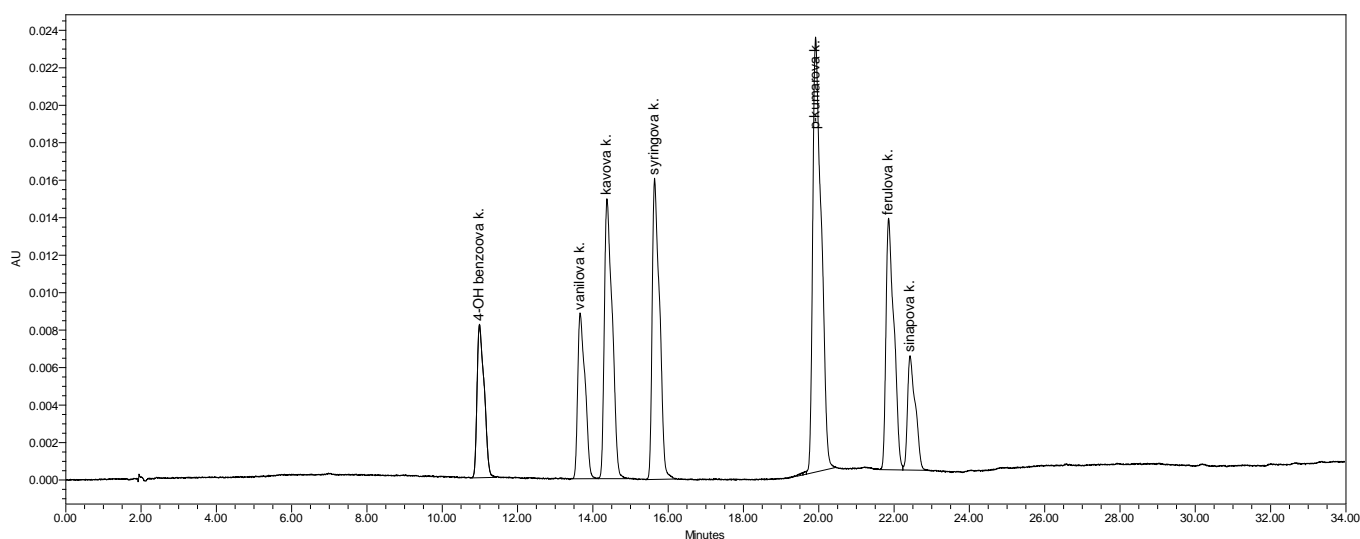


Obrázek 4 Směsný standard fenolických kyselin o koncentraci 50 mg·l<sup>-1</sup> při vlnové délce 330 nm



Tabulka 11 Data pro vytvoření kalibračních křivek pro kyseliny analyzované při vlnové délce 280 nm

Kyselina p – hydroxybenzoová		Kyselina vanillová		Kyselina syringová	
c [mg·l <sup>-1</sup> ]	Plocha píku	c [mg·l <sup>-1</sup> ]	Plocha píku	c [mg·l <sup>-1</sup> ]	Plocha píku
1,05	11 877	1,04	16 163	1,01	39 821
2,09	26 505	2,09	30 958	2,03	56 009
4,19	53 642	4,18	62 895	4,05	115 226
8,38	110 607	8,36	122 264	8,10	233 798
10,48	141 301	10,44	158 338	10,13	292 224
20,95	284 490	20,89	317 859	20,26	592 011
52,38	790 549	52,22	873 143	50,64	1 648 662



Obrázek 5 Směsný standard fenolických kyselin o koncentraci 50 mg·l<sup>-1</sup> při vlnové délce 280 nm

## 4.2 Stanovení fenolických kyselin

Vzorky ječmene, meziproductů výroby sladu a sladu byly odebrány v humnové sladovně Rajhrad a následně byly podrobeny extrakci, jejíž postup byl popsán v kapitole 3.5.1. Takto připravené vzorky byly analyzovány pomocí UHPLC s detektorem diodového pole (PDA). Analyzované fenolické kyseliny se ve vzorcích nachází v koncentracích, které se liší v každém meziproductu sladování.

Součtem pevných podílů alkalických a kyselých extrakcí byl získán obsah vázaných fenolických kyselin. Součtem kapalných podílů alkalických a kyselých extrakcí byl získán obsah fenolických kyselin v esterifikované formě. Volné fenolické kyseliny byly ze vzorku vyextrahovány 70% acetonitrilem.

Tabulka 12 Vzorek A: Obsah fenolických kyselin ve vzorku

kyselina	c [mg·kg <sup>-1</sup> sušiny]			
	vázané	esterifikované	volné	celkové
kávová	23,76	< LOQ	5,45	29,18
p – kumarová	28,48	< LOQ	7,66	36,10
ferulová	730,88	100,06	17,01	846,98
sinapová	14,06	34,88	< LOQ	51,19
p – hydroxybenzoová	< LOQ	22,43	7,02	31,70
vanillová	8,82	4,44	25,72	38,94
syringová	4,12	20,21	11,42	35,71
Σ fenolové kyseliny	812,42	182,02	76,59	1 069,80

Ve vzorku A byly nalezeny všechny sledované fenolické kyseliny. Plně v souladu s literaturou [16] byla nejvíce zastoupena kyselina ferulová (846,98 mg·kg<sup>-1</sup> sušiny), což činí 79,2 % celkového zastoupení všech fenolických kyselin ve vzorku.

Ve volné formě byla nejvíce zastoupena kyselina vanillová. Kyselina sinapová nebyla ve vzorku ve volné formě nalezena (< LOQ).

Ve vázané i esterifikované formě byla nejvíce zastoupena kyselina ferulová, kyselina p – hydroxybenzoová nebyla nalezena ve vázané formě a kyseliny kávová a p – kumarová v esterifikované formě.

Tabulka 13 Vzorek B<sub>1</sub>: Obsah fenolických kyselin ve vzorku

kyselina	c [mg·kg <sup>-1</sup> sušiny]			
	vázané	esterifikované	volné	celkové
kávová	18,67	< LOQ	< LOQ	18,67
p – kumarová	89,42	< LOQ	3,16	92,58
ferulová	554,38	79,28	12,00	645,66
sinapová	10,13	31,94	< LOQ	44,86
p – hydroxybenzoová	10,82	106,17	< LOQ	119,61
vanillová	4,93	8,12	< LOQ	13,05
syringová	< LOQ	19,30	6,74	26,55
Σ fenolové kyseliny	688,86	244,81	27,31	960,99

Ve vzorku B<sub>1</sub> se celkový obsah fenolických kyselin snížil na 89,8 % původního obsahu ve vzorku A. Nejvíce zastoupenou kyselinou ve vzorku B<sub>1</sub> je opět kyselina ferulová. V tomto vzorku obsah kyseliny ferulové tvoří 67,2 % zastoupení všech celkových fenolických kyselin.

Ve volné formě byly analyzovány kyseliny ferulová, syringová a p – kumarová, ostatní kyseliny nebyly nalezeny (< LOQ). V esterifikované formě nebyly nalezeny kyseliny kávová a p – kumarová, ve vázané formě nebyla nalezena kyselina syringová.

Tabulka 14 Vzorek B<sub>2</sub>: Obsah fenolických kyselin ve vzorku

kyselina	c [mg·kg <sup>-1</sup> sušiny]			
	vázané	esterifikované	volné	celkové
kávová	24,80	6,75	< LOQ	31,54
p – kumarová	216,47	6,48	4,65	227,61
ferulová	871,14	67,86	18,84	957,84
sinapová	15,67	24,00	< LOQ	40,86
p – hydroxybenzoová	< LOQ	13,72	11,83	27,55
vanillová	16,40	11,38	13,73	41,51
syringová	6,20	6,51	14,38	27,09
Σ fenolové kyseliny	1 152,68	136,70	64,62	1 354,00

Ve vzorku B<sub>2</sub> se celkový obsah fenolických kyselin zvýšil na 126,6 % původního vzorku. Nejvíce zastoupenou kyselinou v tomto vzorku byla kyselina ferulová (73 %). Ve volné formě nebyly nalezeny kyseliny kávová a sinapová. Ve vázané formě nebyla nalezena kyselina p – hydroxybenzoová. V esterifikované formě byly analyzovány všechny kyseliny, přičemž nejvíce zastoupenou kyselinou byla kyselina ferulová.

Tabulka 15 Vzorek C<sub>1</sub>: Obsah fenolických kyselin

kyselina	c [mg·kg <sup>-1</sup> sušiny]			
	vázané	esterifikované	volné	celkové
kávová	22,18	7,56	< LOQ	29,74
p – kumarová	96,88	9,33	< LOQ	107,91
ferulová	614,93	108,22	11,51	734,65
sinapová	13,77	22,10	< LOQ	35,87
p – hydroxybenzoová	< LOQ	< LOQ	20,11	23,94
vanillová	9,66	12,52	12,39	34,56
syringová	2,66	14,78	18,34	35,78
Σ fenolové kyseliny	760,85	177,56	64,04	1 002,46

Obsah fenolických kyselin ve vzorku C<sub>1</sub> se snížil na 93,7 % původního množství ve vzorku A. Ve vázané a esterifikované formě byla nejvíce zastoupena kyselina ferulová. Ve volné formě byla nejvíce zastoupená kyselina p – hydroxybenzoová. Ve volné formě nebyly nalezeny kyseliny kávová, p – kumarová a sinapová. V esterifikované formě nebyla nalezena kyselina p – hydroxybenzoová a ve vázané formě nebyla nalezena kyselina p – hydroxybenzoová.

Tabulka 16 Vzorek C<sub>2</sub>: Obsah fenolických kyselin

kyselina	c [mg·kg <sup>-1</sup> sušiny]			
	vázané	esterifikované	volné	celkové
kávová	14,93	7,57	< LOQ	23,47
p – kumarová	22,32	13,30	< LOQ	35,62
ferulová	510,02	108,88	4,77	623,67
sinapová	12,33	15,35	< LOQ	27,67
p – hydroxybenzoová	< LOQ	23,36	16,10	39,46
vanillová	11,01	16,53	< LOQ	30,02
syringová	4,91	4,54	2,26	11,72
Σ fenolové kyseliny	575,52	189,54	26,58	791,64

Celkový obsah fenolických kyselin ve vzorku C<sub>2</sub> se snížil na 74 % původního množství ve vzorku A. Ve vázané a esterifikované formě byla nejvíce zastoupena kyselina ferulová. Ve volné formě byla nejvíce zastoupena kyselina p – hydroxybenzoová.

Ve volné formě byly nalezeny kyseliny ferulová, p – hydroxybenzoová a syringová. Ostatní kyseliny nebyly nalezeny (< LOQ). Ve vázané formě nebyla nalezena kyselina p – hydroxybenzoová.

Tabulka 17 Vzorek C<sub>3</sub>: Obsah fenolických kyselin

kyselina	c [mg·kg <sup>-1</sup> sušiny]			
	vázané	esterifikované	volné	celkové
kávová	18,25	14,44	< LOQ	32,69
p – kumarová	107,36	17,38	28,98	153,72
ferulová	633,11	160,97	24,14	818,22
sinapová	11,41	40,90	< LOQ	52,88
p – hydroxybenzoová	7,52	40,00	33,69	81,21
vanillová	11,81	136,84	26,69	175,34
syringová	6,87	12,93	2,52	22,32
Σ fenolové kyseliny	796,32	423,45	116,60	1 336,38

Celkový obsah fenolických kyselin ve vzorku C<sub>3</sub> se zvýšil na 124,9 % původního obsahu ve vzorku A. Ve vázané a esterifikované formě byla nejvíce zastoupená kyselina ferulová. Ve volné formě byla nejvíce zastoupená kyselina p – hydroxybenzoová. Kyselina ferulová tvořila 61,2 % všech fenolických kyselin ve vzorku.

Ve vázané a esterifikované formě byly analyzovány veškeré fenolické kyseliny. Ve volné formě nebyly nalezeny kyseliny kávová a sinapová.

Tabulka 18 Vzorek D: Obsah fenolických kyselin

kyselina	c [mg·kg <sup>-1</sup> sušiny]			
	vázané	esterifikované	volné	celkové
kávová	24,03	< LOQ	< LOQ	24,20
p – kumarová	190,64	18,02	28,76	237,42
ferulová	852,29	202,96	29,33	1 084,57
sinapová	14,92	61,89	< LOQ	77,40
p – hydroxybenzoová	< LOQ	24,75	57,95	84,54
vanillová	16,92	38,09	43,55	98,56
syringová	5,36	21,02	7,06	33,44
Σ fenolové kyseliny	1 106,00	366,89	167,22	1 640,11

Ve vzorku D se zvýšil obsah fenolických kyselin na 153,3 % původního vzorku A. Nejvíce zastoupenou celkovou kyselinou byla kyselina ferulová (66,1 %). Ve vázané a esterifikované formě byla nejvíce zastoupená kyselina ferulová, ve volné formě to byla kyselina p – hydroxybenzoová.

Ve vázané formě nebyla nalezena kyselina p – hydroxybenzoová. V esterifikované formě nebyla nalezena kyselina kávová a ve volné formě nebyly nalezeny kyseliny kávová a sinapová.

Tabulka 19 Vzorek E: Obsah fenolických kyselin ve vzorku

kyselina	c [mg·kg <sup>-1</sup> sušiny]			
	vázané	esterifikované	volné	celkové
kávová	21,21	2,30	2,00	25,50
p – kumarová	119,28	< LOQ	6,48	127,47
ferulová	719,35	38,48	22,66	780,49
sinapová	18,86	19,09	11,56	49,51
p – hydroxybenzoová	4,90	18,21	15,01	38,11
vanillová	11,62	44,87	19,14	75,63
syringová	6,22	9,13	6,34	21,68
Σ fenolové kyseliny	901,44	133,78	83,18	1118,39

Ve vzorku E se zvýšil obsah fenolických kyselin na 104,5 % původního množství ve vzorku A. V celkových fenolických kyselinách byla nejvíce zastoupená kyselina ferulová (69,8 %). Ve vázané a volné formě byla nejvíce zastoupená kyselina ferulová, v esterifikované formě byla nejvíce zastoupená kyselina vanillová.

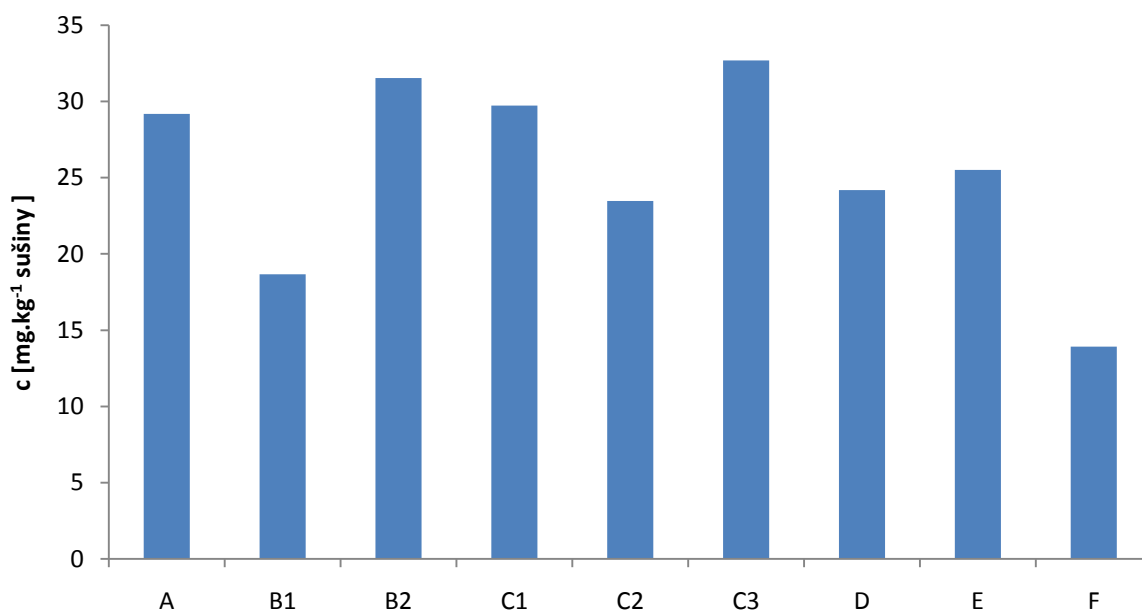
V esterifikované formě nebyla nalezena kyselina p – kumarová. Ve volné a vázané formě byly analyzovány všechny fenolické kyseliny.

Tabulka 20 Vzorek F: Obsah fenolických kyselin ve vzorku

F	c [mg·kg <sup>-1</sup> sušiny]			
	vázané	esterifikované	volné	celkové
kyselina kávová	2,33	2,87	8,73	13,93
p – kumarová	111,46	15,59	202,86	329,90
ferulová	1 084,44	93,68	132,51	1 310,64
sinapová	18,26	25,77	18,70	62,73
p – hydroxybenzoová	36,48	11,71	40,42	88,60
vanillová	29,14	62,70	279,39	371,23
syringová	10,87	35,08	126,58	172,52
Σ fenolové kyseliny	1 292,97	247,39	809,19	2 349,55

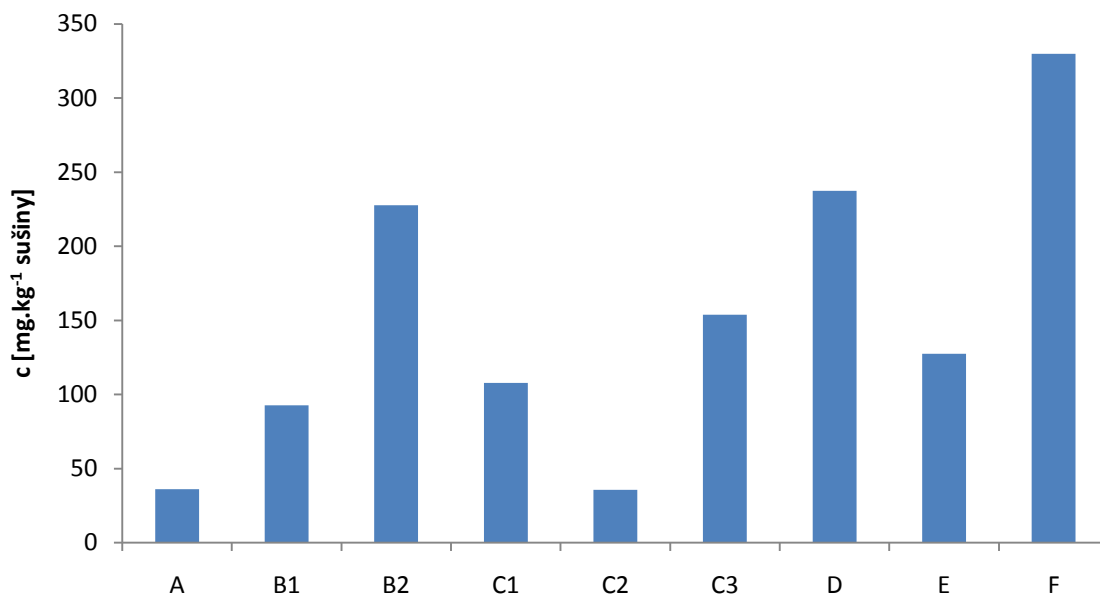
Ve vzorku F se zvýšil obsah fenolických kyselin na 219,6 % původního vzorku A. Nejvíce zastoupenou celkovou fenolickou kyselinou byla kyselina ferulová (55,8 %). Ve vázané a esterifikované formě byla nejvíce zastoupenou fenolickou kyselinou kyselina ferulová. Ve volné formě byla nejvíce zastoupenou fenolickou kyselinou kyselina vanillová. Ve vzorku F byly všechny analyzované fenolické kyseliny nalezeny.

Zastoupení fenolických kyselin v jednotlivých meziproduktech sladování uvádí Obrázek 6 až Obrázek 12.



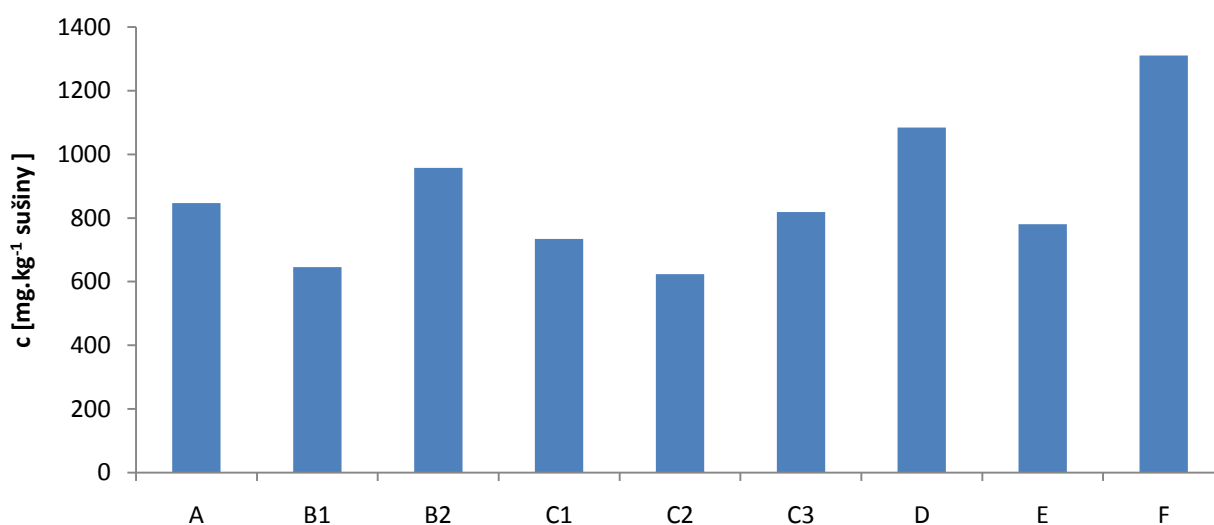
Obrázek 6 Zastoupení kyseliny kávové v jednotlivých meziproduktech sladování v celkovém množství

Kyselina kávová byla v celkovém množství analyzována ve všech meziproduktech v koncentraci 13,93 – 32,69 mg.kg<sup>-1</sup> sušiny. Nejméně byla zastoupena ve vzorku F. Nejvíce byla zastoupena ve vzorku C<sub>3</sub>.



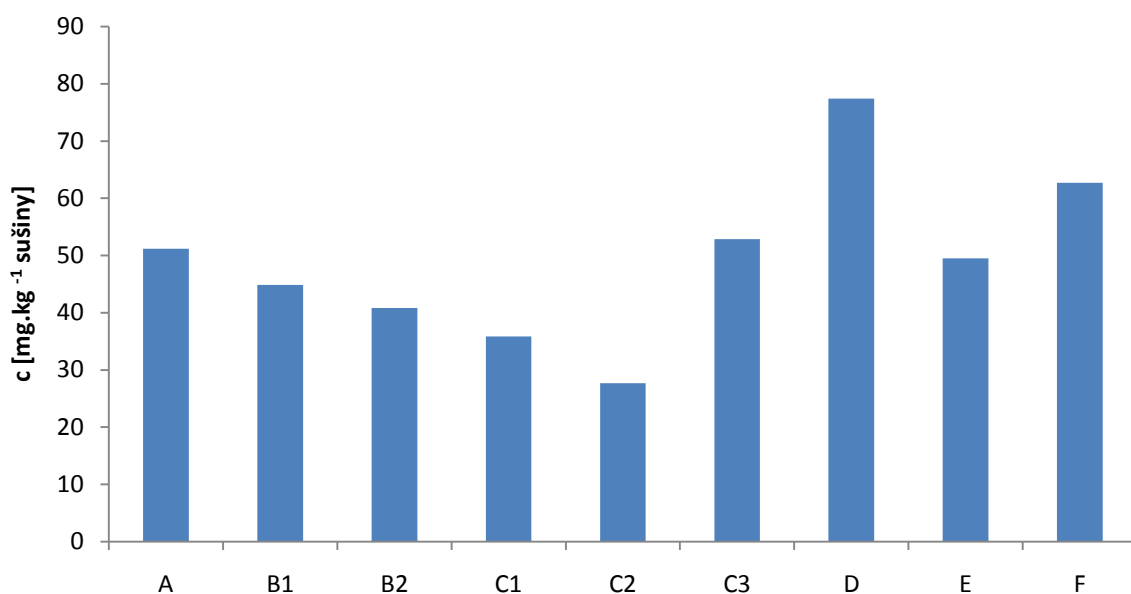
Obrázek 7 Zastoupení kyseliny p – kumarové v jednotlivých meziproduktech sladování

Kyselina p – kumarová byla v celkovém množství analyzována ve všech meziproduktech v koncentraci 35,62 – 329,90 mg.kg<sup>-1</sup> sušiny. Nejméně byla zastoupená ve vzorku C<sub>2</sub>. Nejvíce byla zastoupená ve vzorku F.



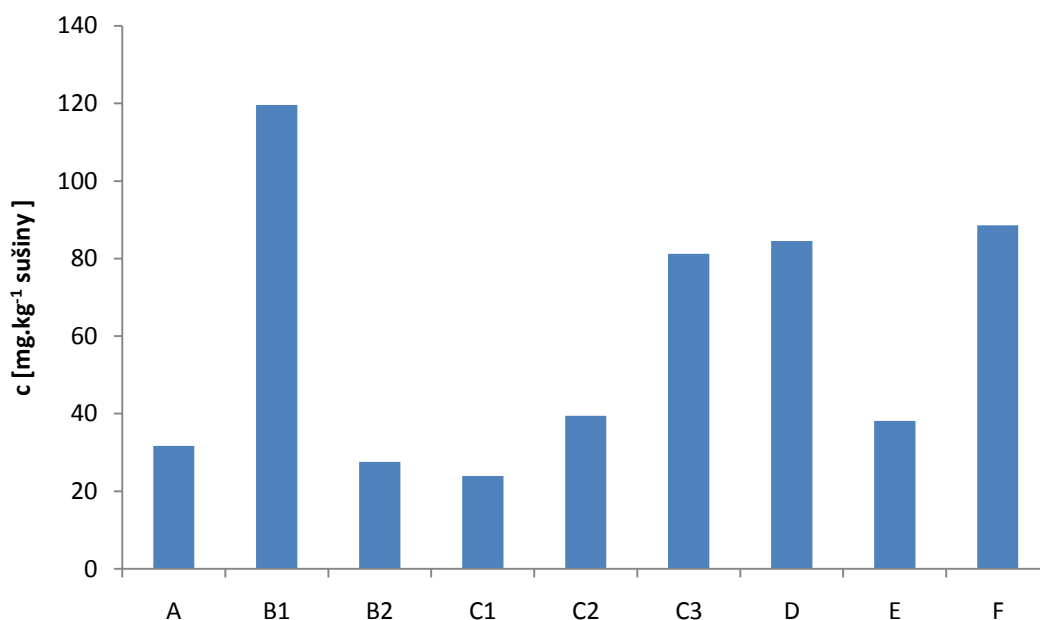
Obrázek 8 Zastoupení kyseliny ferulové v jednotlivých meziproduktech sladování

Kyselina ferulová byla v celkovém množství analyzována ve všech meziproduktech v koncentraci 623,67 – 1 310,64 mg.kg<sup>-1</sup> sušiny. Nejméně byla zastoupená ve vzorku C<sub>2</sub>. Nejvíce byla zastoupená ve vzorku F.



Obrázek 9 Zastoupení kyseliny sinapové v meziproduktech sladování

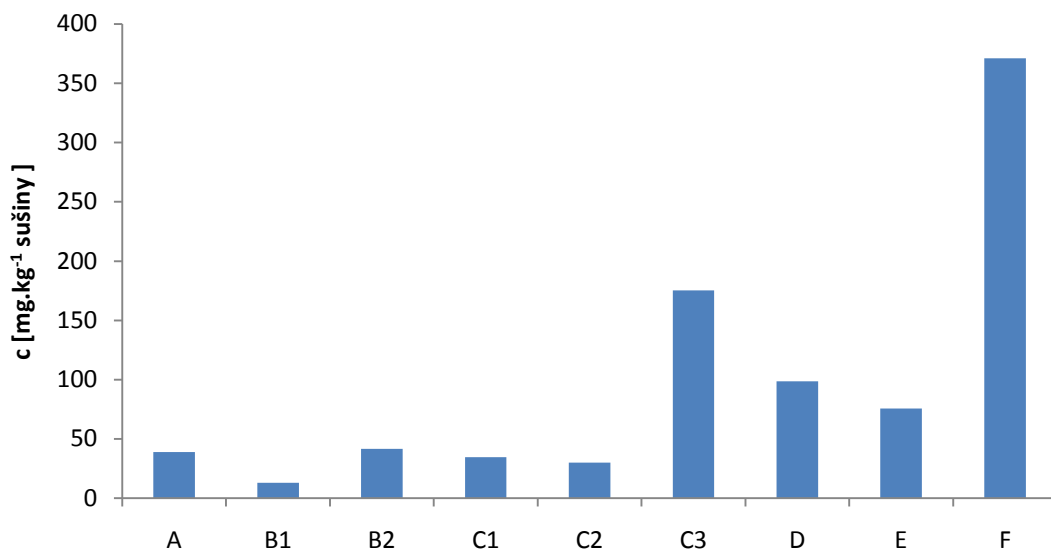
Kyselina sinapová byla v celkovém množství analyzována ve všech meziproduktech v koncentraci 27,67 – 77,40 mg.kg<sup>-1</sup> sušiny. Nejméně byla zastoupená ve vzorku C<sub>2</sub>. Nejvíce byla zastoupená ve vzorku D.



Obrázek 10 Zastoupení kyseliny p – hydroxybenzoové v jednotlivých meziproduktech sladování

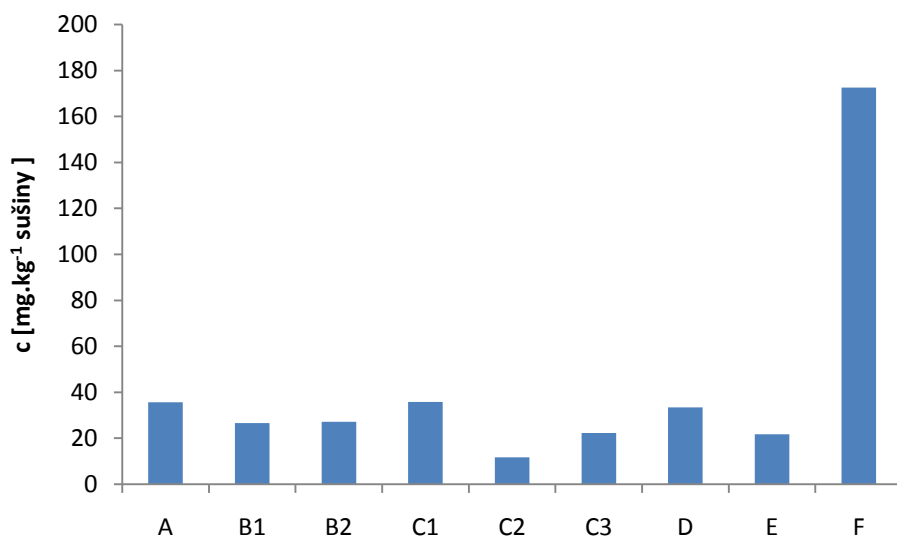


Kyselina p – hydroxybenzoová byla v celkovém množství analyzována ve všech meziproduktech v koncentraci 23,9 – 119,61 mg.kg<sup>-1</sup> sušiny. Nejméně byla zastoupená ve vzorku C<sub>1</sub>. Nejvíce byla zastoupená ve vzorku B<sub>1</sub>.



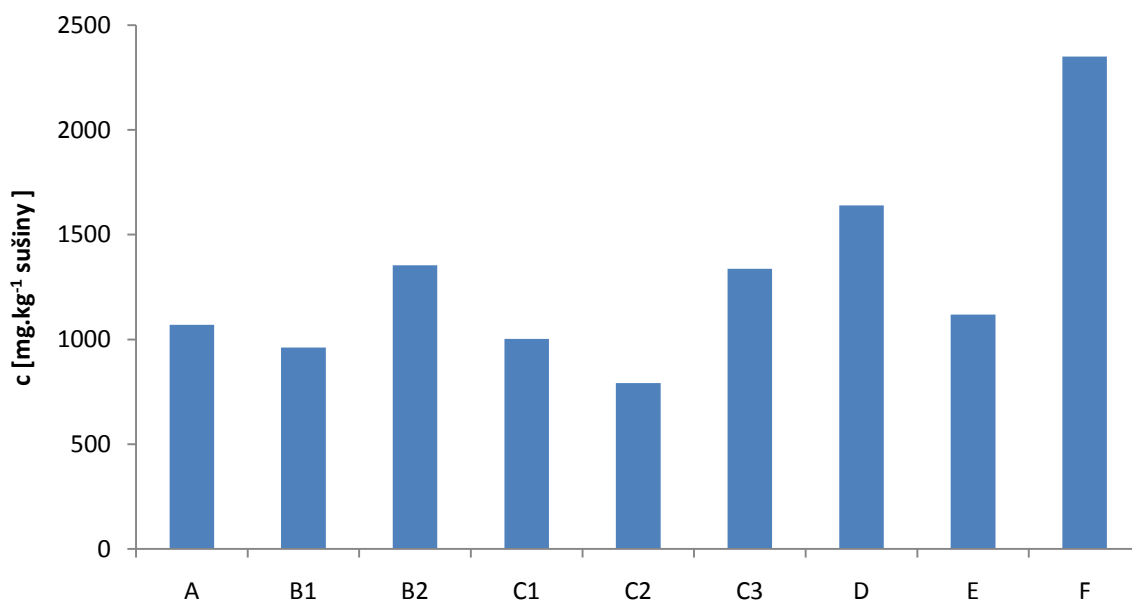
Obrázek 11 zastoupení kyseliny vanilové v jednotlivých meziproduktech sladování

Kyselina vanillová byla v celkovém množství analyzována ve všech meziproduktech v koncentraci 13,05 – 371,23 mg.kg<sup>-1</sup> sušiny. Nejméně byla zastoupená ve vzorku B<sub>1</sub>. Nejvíce byla zastoupená ve vzorku F.



Obrázek 12 Zastoupení kyseliny syringové v jednotlivých meziproduktech sladování

Kyselina syringová byla v celkovém množství analyzována ve všech meziproduktech v koncentraci 11,72 – 172,52 mg.kg<sup>-1</sup> sušiny. Nejméně byla zastoupená ve vzorku C<sub>2</sub>. Nejvíce byla zastoupená ve vzorku F.



Obrázek 13 Porovnání jednotlivých celkových fenolických kyselin v jednotlivých meziproduktech

Při porovnání výsledků obsahu celkových fenolických kyselin v jednotlivých meziproduktech je zřejmé, že nejvíce celkových fenolických kyselin bylo nalezeno ve vzorku F. Nejméně celkových fenolických kyselin bylo nalezeno ve vzorku C<sub>2</sub>.

## 5 Závěr

V teoretické části byla vypracována rešerše, týkající se fenolických kyselin a to kyseliny kávové, p – kumarové, ferulové, sinapové, p – hydroxybenzoové, vanillové a syringové, které byly analyzovány v meziproduktech sladování. V teoretické části byla též popsána technologie výroby sladu.

Uvedené fenolické kyseliny jsou řazeny do skupiny antioxidantů. Díky tomu jsou tyto látky pro člověka užitečné při jejich příjmu. V ječmeni se tyto látky nachází v obilce. Tyto kyseliny mohou ovlivňovat při výrobě piva charakteristickou chuť piva.

Experimentální část byla zaměřena na přípravu vzorků ječmene a sladu. Vzorky byly odebírány ve sladovně v Rajhradu z různých meziproductů sladování. Jednotlivé meziproducty uvádí Tabulka 7. Vzorky byly podrobeny jak kyselému, tak alkalickému hydrolyze ve vodné i pevné formě. Takto extrahované vzorky jednotlivých meziproductů byly stanoveny pomocí ultra rychlé kapalinové chromatografie s PDA detekcí. Kvantifikace byla provedena metodou vnějších standardů (metodou kalibrační přímky). Pro každou fenolickou kyselinu byla stanovena mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ).

Analyzované fenolické kyseliny se ve vzorcích nachází v koncentracích, které se liší v každém meziproductu sladování. Součtem pevných podílů alkalických a kyselých extrakcí byl získán obsah vázaných fenolických kyselin. Součtem kapalných podílů alkalických a kyselých extrakcí byl získán obsah fenolických kyselin v esterifikované formě. Volné fenolické kyseliny byly ze vzorku vyextrahovány 70% acetonitrilem. Obsah celkových fenolických kyselin byl získán součtem jednotlivých volných, esterifikovaných a vázaných frakcí.

Obsah celkových fenolických kyselin se v jednotlivých meziproductech pohyboval v koncentraci 791,6 – 2349,6 mg.kg<sup>-1</sup>sušiny. Ve vzorcích byla nejvíce zastoupena kyselina ferulová. Její koncentrace byla 623,67 – 1310,64 mg.kg<sup>-1</sup> sušiny, což činilo 55,8 – 79,2 % celkového obsahu všech sledovaných fenolických kyselin.

Dalšími významnými celkovými fenolickými kyselinami, které byly nalezeny v jednotlivých vzorcích, byly kyselina sinapová, kávová a p – kumarová. V nižších koncentracích byly analyzovány kyselina syringová, vanillová a p – hydroxybenzoová.

Jednotlivé fenolické kyseliny reagují různě na změnu obsahu vody v ječmeni. Ovlivňujícím faktorem různého obsahu jednotlivých fenolických kyselin v jednotlivých meziproductech, byly enzymy, které se postupnými úpravami aktivovaly nebo deaktivovaly [15]. Dalším faktorem, který mohl ovlivnit zastoupení jednotlivých kyselin v meziproductech, byly vnější faktory, kterými jsou dešťové srážky, půda a celkové pěstební podmínky ječmene. Důvodem je to, že již při pěstování jsou tyto látky v ječmeni, ale až při zpracování mohou být aktivovány, nebo deaktivovány [5].

## 6 Seznam použitých zdrojů

- [1] HERNANZ, D, V NUÑEZ, AI SANCHO, CB FAULDS, G WILLIAMSON, B BARTOLOMÉ a GÓMEZ – CORDOVÉS. 2001. Hydroxycinnamic acids and ferulic acid dehydrodimers in barley and processed barley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (49).
- [2] BASAŘOVÁ, Gabriela. *Pivovarství: teorie a praxe výroby piva*. Vyd. 1. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010, 863 s. ISBN 978– 80– 7080– 734– 7.
- [3] INNS, E.L. a BUGGEY. . Effect of stimulated kilning regime on the profile and antioxidant activity of the free phenolic acids extracted from green malt. *Master Brewers Association of the Americas*. 2005, č. 3.
- [4] AL]., [contributions by S. Aastrup ... et]. *Proceedings of the 28th EBC congress, Budapest 2001*. Nürnberg: Fachverlag Hans Carl, 2001. ISBN 90– 701– 4321– 6.
- [5] BASAŘOVÁ, Gabriela. *Sladařství: teorie a praxe výroby sladu*. Vyd. 1. Praha: Havlíček Brain Team, 2015, 626 s. ISBN 978– 80– 87109– 47– 2.
- [6] BRIGGS, D. *Malts and malting: teorie a praxe výroby sladu*. 1st ed. New York: Blackie Academic, 1998, xviii [sic], 796 p. ISBN 04– 122– 9800– 7.
- [7] MAILARD, M.N a C. BERSET. Evolution of antioxidant activity during kilning: role of insoluble bound phenolic acids of barley and malt. *Food chemistry*. 1995, č. 43.
- [8] SLANINA, Jiří a Eva TÁBORSKÁ. Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. *Chemické listy*. 2004, č. 98.
- [9] MUSSATO, DRAGONE a ROBERTO. Ferulic and p – coumaric acids extraction by alkaline hydrolysis of brewer's spent grain. *Science direct*. 2007, č. 1.
- [10] BĚLÁKOVÁ, Sylvie, Karolína BENEŠOVÁ, Renata MIKULÍKOVÁ a Zdeněk SVOBODA. Sledování změn obsahu ferulové kyseliny v pivovarských surovinách metodou UPLC s PDA detekcí. *Kvasný průmysl*. 2010, roč. 56, č. 6.
- [11] MIKYŠKA, Alexandr, Ivo HARTMAN a Danuša HAŠKOVÁ. Polyfenolické látky a antioxidační vlastnosti odrůd ječmene doporučených pro České pivo. *Kvasný průmysl*. 2011, č. 7.
- [12] KELLNER, Vladimír a Pavel ČEJKA. Studium jednoduchých polyfenolových látek v pivech různé provenience. *Kvasný průmysl*. 2010, č. 5.
- [13] DVOŘÁKOVÁ, Markéta, Pavel DOSTÁLEK a Zuzana SKULILOVÁ. Polyfenoly ječmene a sladu a jejich antioxidační vlastnosti. *Kvasný průmysl*. 2010, č. 3.
- [14] BASAŘOVÁ G. A KOL. *Sladařství a pivovarství*. Praha: SNTL, 1985.
- [15] KOSAŘ, Karel. *Technologie výroby sladu a piva*. 1. vyd. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, 2000, 398 s. ISBN 80– 902– 6586– 3.
- [16] KARABÍN, Marcel, Štěpán HALAMA a Lukáš JELÍNEK. Porovnání českých a čínských odrůd ječmene s ohledem na technologicky významné polyfenolické látky. *Kvasný průmysl*. 2013, č. 12.
- [17] NOVÁKOVÁ, Lucie. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 1. vyd. Praha: Lucie Nováková, 2013, 299 s. ISBN 978– 80– 260– 4243– 3.
- [18] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 1. vyd. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013, 2 sv. (299, 235 s.). ISBN 978– 80– 260– 4243– 3.
- [19] SOMMER, Lumír. *Základy analytické chemie*. Vyd. 1. Brno: VUTIUM, 2000, 347 s. ISBN 80– 214– 1742– 0.

- [20] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin*. Rozšířené a přepracované. 3. vydání. Tábor: OSSIS, 2009, 2 sv. ISBN 978– 80– 86659– 17– 6.
- [21] NGUYEN, Dao a GUILLARME. Pharmaceutical applications on columns packed with sub 2 µm particles. *Journal of chromatographic science*. 2008, č. 46.
- [22] WU, Naijun a Andrew CLAUSEN. Fundamental and practical aspects of ultra high pressure liquid chromatography for fast separations. *Journal of separation science*. 2007, č. 30.
- [23] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2., opr. vyd. Praha: Academia, c1996, 180, 135, 191 s. ISBN 9788020006004.
- [24] MÍKA, Vladimír. *Základy chemického inženýrství*. Praha: SNTL, 1981.
- [25] KADLEC, Pavel, Karel MELZOCH a Michal VOLDŘICH. *Procesy a zařízení v potravinářství a biotechnologiích*. Vyd. 1. Ostrava: Key Publishing, 2013, 496 s. Monografie (Key Publishing). ISBN 978– 80– 7418– 163– 4.
- [26] DVOŘÁKOVÁ, Markéta, Pavel DOSTÁLEK a Petr HULÍN. Analytické metody stanovení polyfenolů ve sladinách, mladínách a pivech. *Kvasný průmysl*. 2006, roč. 52, č. 4.
- [27] KADLEC, Pavel, Karel MELZOCH a Michal VOLDŘICH. *Přehled tradičních potravinářských výrob: technologie potravin*. Vyd. 1. Ostrava: Key Publishing, 2012, 569 s. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-145-0.
- [28] ČEPIČKA, J. a M. KARABÍN. Polyphenolic compounds of beer – natural antioxidants. *Chemické listy*. 2002, č. 96.
- [29] KELLNER, V., P. ČEJKA, J. ČULÍK, T. HORÁK a M. JURKOVÁ. Pozitivní přínosy piva ke zdraví spotřebitele. *Kvasný průmysl*. 2002, č. 48.

## **7 Seznam použitých zkratk a symbolů**

VÚPS – výzkumný ústav pivovarský a sladařský

LLE – extrakce kapalina – kapalina

SPE – extrakce na pevné fázi

PVPP – polyvinylpyrolidon

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

UV – VIS – ultrafialová – viditelná oblast

GC – plynová chromatografie

PC – papírová chromatografie

TLC – chromatografie na tenké vrstvě

UHPLC/UPLC – ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie

PDA – detektor diodového pole

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

LOD – mez detekce

LOQ – mez stanovitelnost

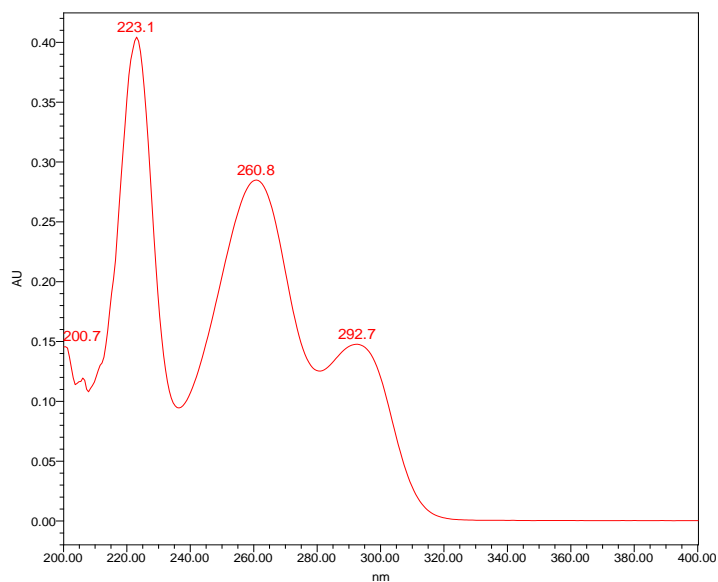
LDL – low density cholesterol (nízkodenzitní cholesterol)

## **8 Seznam příloh**

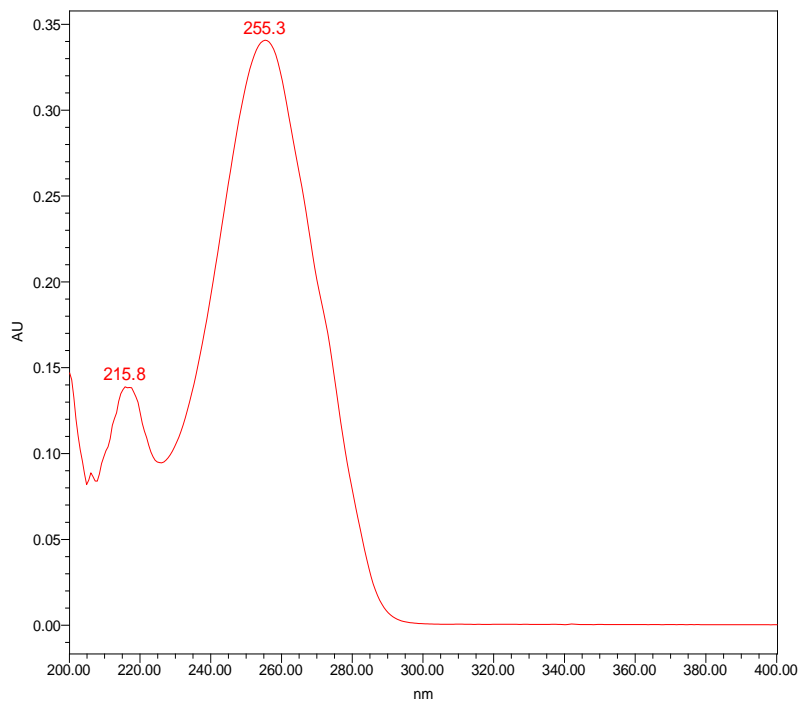
- I. Absorpční spektra jednotlivých fenolických kyselin
- II. Vybrané chromatogramy vzorků

## 9 Přílohy

### 9.1 Absorpční spektra jednotlivých fenolických kyselin

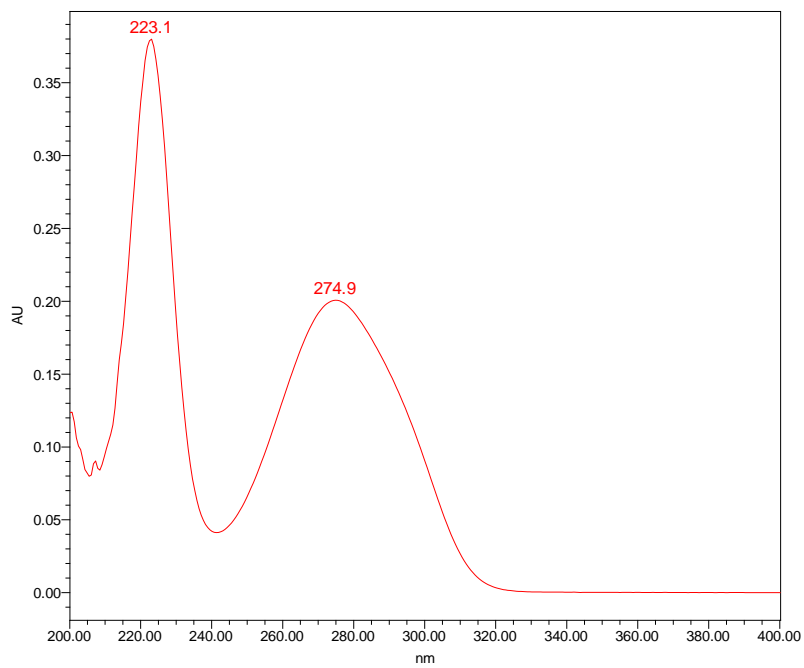


Obrázek 14 Absorpční spektrum kyseliny vanillové

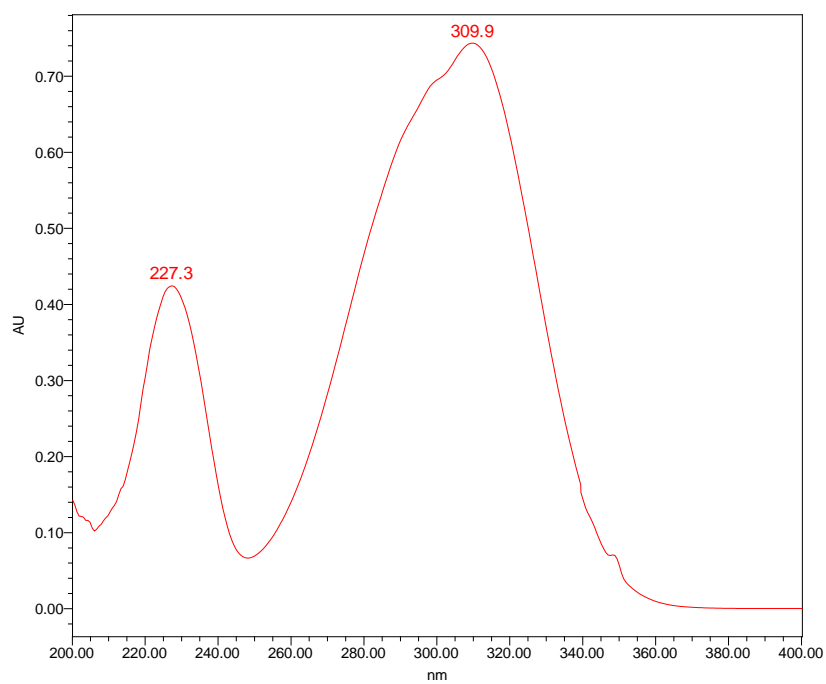


Obrázek 15 Absorpční spektrum kyseliny p – hydroxybenzoové

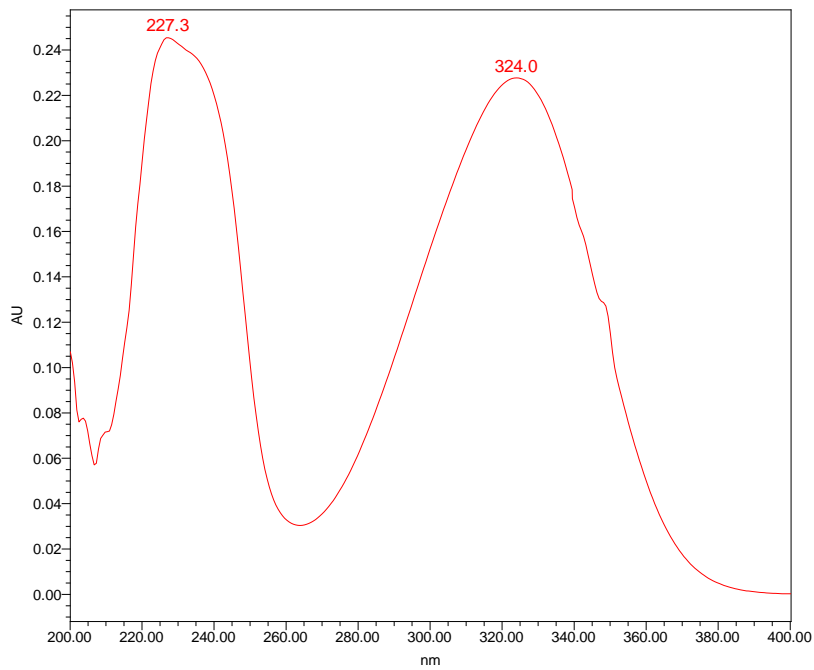




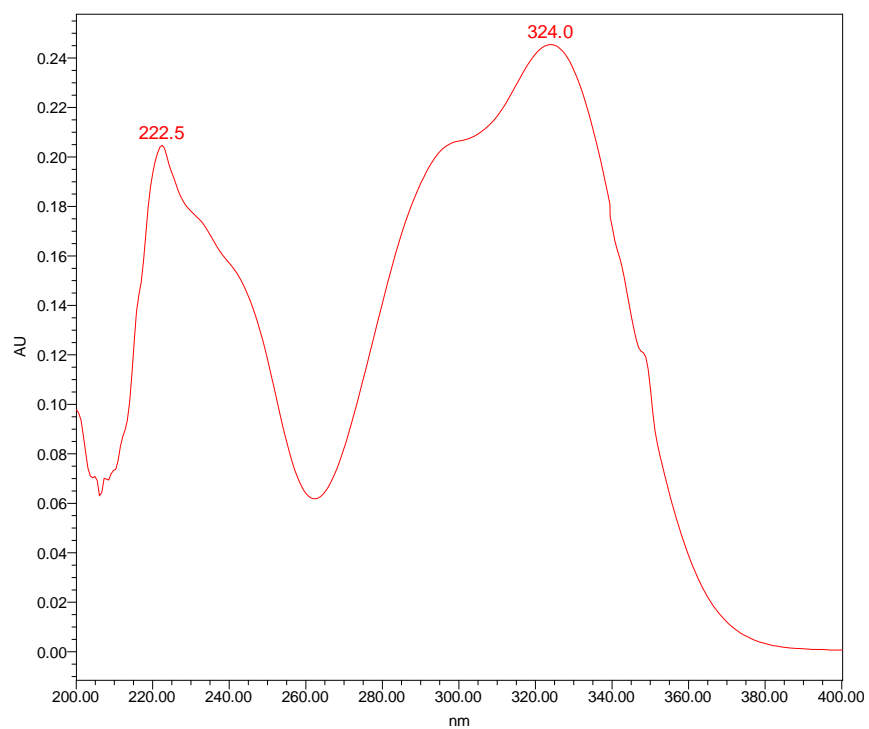
Obrázek 16 Absorpční spektrum kyseliny syringové



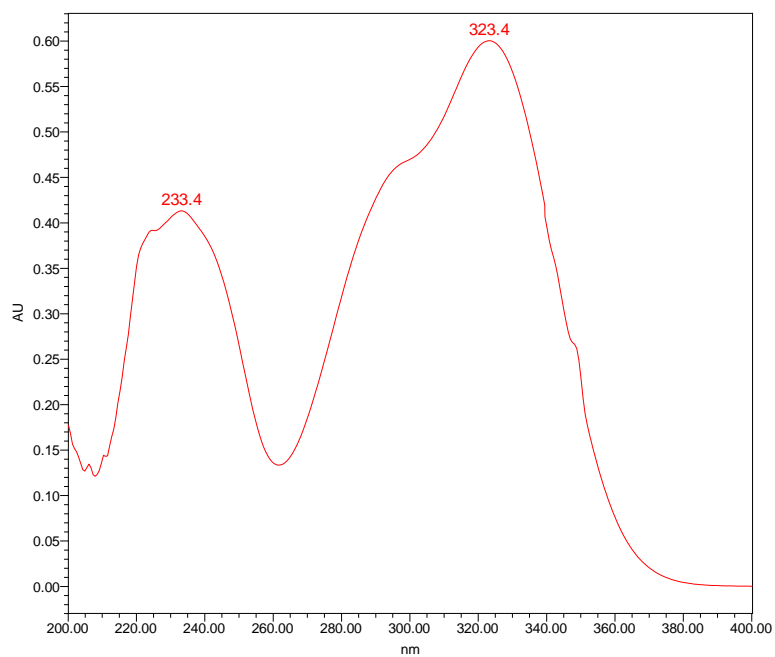
Obrázek 17 Absorpční spektrum kyseliny p – kumarové



Obrázek 18 Absorpční spektrum kyseliny sinapové

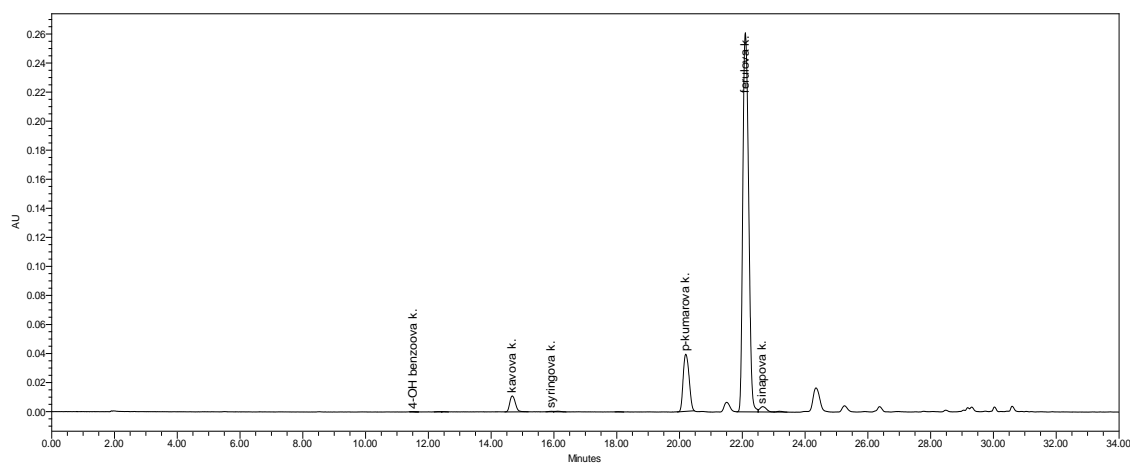


Obrázek 19 Absorpční spektrum kyseliny kávové

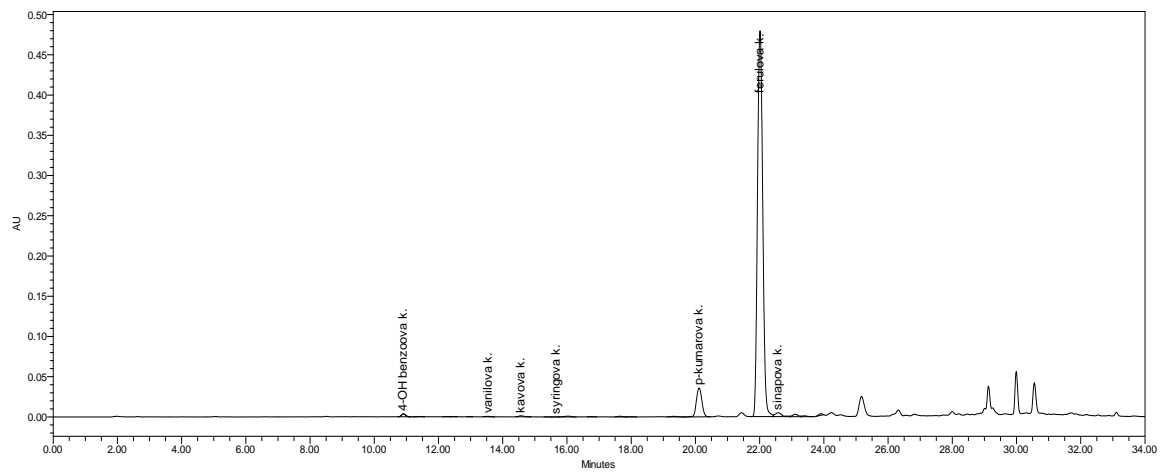


Obrázek 20 absorpční spektrum kyseliny ferulové

## 9.2 Vybrané chromatogramy vzorků



Obrázek 21 Chromatogram ječmene – alkalická hydrolyza, detekce při vlnové délce 330 nm



Obrázek 22 Chromatogram sladového květu – alkalická hydrolyza, detekce při 330 nm