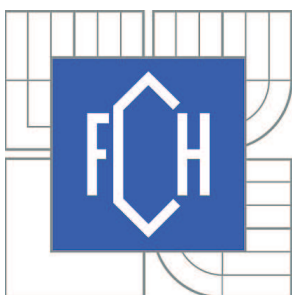


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

## OBSAH RUTINU VE VYBRANÝCH ODRŮDÁCH BEZU ČERNÉHO

CONTENT OF RUTIN IN SELECTED ELDERBERRY CULTIVARS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

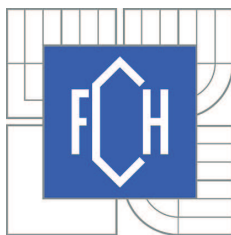
Bc. MAGDALENA PÍŠŤKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. MILENA VESPALCOVÁ, Ph.D.

BRNO 2011



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

## Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	<b>FCH-DIP0520/2010</b>	Akademický rok: <b>2010/2011</b>
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	<b>Bc. Magdalena Pišťková</b>	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	<b>RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.</b>	
Konzultanti:		

### Název diplomové práce:

Obsah rutinu ve vybraných odrůdách bezu černého

### Zadání diplomové práce:

Teoretická část:

- 1) Popis bezu černého
- 2) Chemické vlastnosti flavonoidů rutinu a kvercetinu, jejich možné využití v potravních doplncích
- 3) Popis extrakční techniky PSE (pressurized solvent extraction)
- 4) Přehled HPLC systémů pro separaci rutinu a kvercetinu

Experimentální část:

- 1) Ověření vybraného separačního systému na standardech
- 2) Extrakce rostlinného materiálu technikou PSE
- 3) HPLC analýzy připravených rostlinných extraktů
- 4) Vyhodnocení provedených experimentů

### Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2011

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

-----  
Bc. Magdalena Pišťková  
Student(ka)

-----  
RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.  
Vedoucí práce

-----  
doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 15.1.2011

-----  
prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.  
Děkan fakulty

## ABSTRAKT

Náplní diplomové práce bylo stanovení obsahu rutinu ve větvičkách a listech devatenácti odrůd bezu černého (*Sambucus nigra* L.) kapalinovou chromatografií. Dále bylo provedeno měření rutinu v jeho významných zdrojích, routě a pohance. Naměřené hodnoty byly porovnány s významnými zdroji rutinu.

Teoretická část popisuje bez černý, jeho obecné znaky, chemické složení, využití v lékařství. Další část je zaměřena na významné látky obsažené v bezu černém; flavonoidy. Jsou zde popsány extrakční techniky a vysokoúčinná kapalinová chromatografie. V praktické části byla pro získání látek z rostlinné matrice použita metoda extrakce stlačenou kapalnou horkou vodou (PHWE), která probíhala ve 3 cyklech po 5 minutách. Byla použita teplota 80°C, tlak 150 barů. Následovalo přečištění přes SPE kolonky a HPLC analýza s detekcí diodovým polem při vlnové délce 360 nm. Byla použita kolona SUPELCOSIL<sup>TM</sup> LC-8DB, mobilní fáze MeOH:H<sub>2</sub>O:HCOOH v poměru 36:61,5:2,5 s průtokem 1 ml.min<sup>-1</sup>.

Nejvíce rutinu bylo obsaženo v listech odrůdy Pregarten,  $26,34 \pm 0,50$  mg.g<sup>-1</sup>. V listech bylo nejnižší množství rutinu stanoveno u odrůdy Körsör, a to  $3,74 \pm 0,13$  mg.g<sup>-1</sup>. U větviček bylo nejvyšší množství rutinu stanoveno u odrůdy Samyl, kde bylo naměřeno  $4,87 \pm 0,01$  mg.g<sup>-1</sup> rutinu, nejnižší množství bylo stanoveno u odrůdy Heidegg 13 s  $0,56 \pm 0,01$  mg.g<sup>-1</sup>. Mez detekce pro rutin byla stanovena na  $6,3 \cdot 10^{-5}$  mg.ml<sup>-1</sup> a mez stanovitelnosti na  $2,1 \cdot 10^{-4}$  m.ml<sup>-1</sup>.

## KLÍČOVÁ SLOVA

rutin, kvercetin, černý bez, SPE, PSE, PHWE, HPLC

## ABSTRACT

The aim of this diploma thesis was to determine the rutin content in springs and leaves of 19 elderberry species (*Sambucus nigra* L.) with use of liquid chromatography. Furthermore the rutin content was determined in its significant sources – rue and buckwheat. The observed values were compared in order to answer the question whether it is useful to use the elderberry spring and leaves as a new source of rutin.

Theoretical part of the thesis describes elderberry in general, its chemical composition and its usage in medicine. Following part concentrates on important substances contained in elderberry – flavonoids. Also principles of extraction techniques and HPLC are discussed.

In practice the rutin was gained from plant matrix with use of pressurized hot water extraction (PHWE) which was performed in three five minutes long cycles. Conditions during the PHWE were set up to 80 °C and 150 bars. Obtained extract was purified with use of SPE columns and analyzed by HPLC with DAD detector (wave length – 360 nm). HPLC was performed with SUPELCOSIL™ LC-8DB column. The mobile phase was composed of MeOH, H<sub>2</sub>O, and HCOOH in ration of 36:61,5:2,5. The set up flow of mobile phase was 1 ml.min<sup>-1</sup>.

In the leaves the highest rutin content was determined in Pregarten -26,34 ± 0,50 mg.g<sup>-1</sup>. On the other hand the lowest rutin content in leaves was determined in Körsör – 3,74 ± 0,13 mg.g<sup>-1</sup>. In springs the obtained results were as follow. The highest content was determined in Samyl – 4,87 ± 0,01 mg.g<sup>-1</sup> and the lowest content was determined in Heidegg 13 springs – 0,56 ± 0,01 mg.g<sup>-1</sup>. Also the HPLC detection limit – 6,3 · 10<sup>-5</sup> mg.ml<sup>-1</sup> and quantitation limit – 2,1 · 10<sup>-4</sup> mg.ml<sup>-1</sup> were determined for rutin.

## KEYWORDS

rutin, quercetin, elderberry, SPE, PSE, PHWE, HPLC

PÍŠŤKOVÁ, M. *Obsah rutinu ve vybraných odrůdách bezu černého*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 71 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová 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.

## **PODĚKOVÁNÍ**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucí mé diplomové práce RNDr. Mileně Vespalcové Ph.D. za odborné vedení. Můj dík patří také pracovníkům Ústavu analytické chemie v Brně za jejich čas a cenné rady.

# OBSAH

<b>1 ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
<b>2 TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>9</b>
<b>2.1 Bez černý</b> .....	<b>9</b>
2.1.1 Obecné znaky .....	9
2.1.2 Výskyt .....	10
2.1.3 Bez černý jako droga .....	10
2.1.4 Obsahové látky .....	11
2.1.5 Pěstování, výsadba, rozmnožování, ošetřování a ochrana rostlin .....	12
2.1.6 Využití v lékařství .....	12
<b>2.2 Flavonoidy</b> .....	<b>13</b>
2.2.1 Chemická struktura flavonoidů .....	13
2.2.2 Zdroje flavonoidů .....	15
2.2.3 Vlastnosti flavonoidů .....	16
2.2.4 Kvercetin .....	18
2.2.4.1 Obecné vlastnosti a výskyt .....	18
2.2.4.2 Farmakologické účinky .....	18
2.2.4.3 Absorpce v organismu .....	19
2.2.5 Rutin .....	19
2.2.5.1 Obecné vlastnosti a výskyt .....	19
2.2.5.2 Farmakologické a biologické účinky .....	19
2.2.6 Rutin jako doplněk stravy .....	20
2.2.7 Metabolismus flavonoidů .....	23
<b>2.3 PSE extrakce</b> .....	<b>23</b>
2.3.1 Princip PSE extrakce <sup>42</sup> .....	23
2.3.2 Výhody PSE <sup>39</sup> .....	25
2.3.3 Typy přístrojů pro tlakovou extrakci .....	25
2.3.3.1 One PSE <sup>40</sup> .....	25
2.3.3.2 Fast PSE .....	26
<b>2.4 PHWE extrakce</b> .....	<b>27</b>
<b>2.5 SPE extrakce</b> .....	<b>27</b>
2.5.1 Princip SPE extrakce .....	27
2.5.2 Sorbenty .....	27
2.5.3 SPE analýza potravin .....	28
<b>2.6 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)</b> .....	<b>28</b>
2.6.1 Přednosti HPLC .....	29
2.6.2 Chromatografická separace .....	29
2.6.3 Stacionární fáze v HPLC .....	29
2.6.4 Mobilní fáze v HPLC <sup>39</sup> .....	30
2.6.5 Instrumentace v HPLC <sup>51</sup> .....	30
2.6.6 Derivatizace <sup>39</sup> .....	32
2.6.7 HPLC flavonoidů .....	32
2.6.7.1 Studie o HPLC stanovení flavonoidů bezu černého a jejich antioxidační aktivity .....	33
2.6.7.2 HPLC podmínky separace pro rutin, kvercetin a pro rutin a kvercetin ve směsi .....	34

<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>38</b>
3.1	Pomůcky .....	38
3.2	Přístroje .....	38
3.3	Chemikálie.....	38
3.4	Materiál .....	38
3.5	Úprava rostlinných matric.....	40
3.6	Extrakční techniky .....	41
3.6.1	PHWE extrakce .....	41
3.6.2	SPE extrakce.....	42
3.7	HPLC analýza .....	43
3.8	Mez detekce a mez stanovitelnosti.....	43
3.9	Kalibrační křivka rutinu.....	44
3.9.1	Přepočet koncentrace rutinu na gram reálného vzorku.....	44
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>45</b>
4.1	Optimalizace separačního systému HPLC .....	45
4.2	Extrakční techniky .....	45
4.2.1	PHWE.....	45
4.2.2	SPE.....	46
4.3	Mez detekce a mez stanovitelnosti.....	47
4.4	Kalibrační křivka rutinu.....	48
4.5	Obsah rutinu v bezu černém.....	50
4.5.1	Rutin v listech.....	50
4.5.2	Rutin ve větvičkách .....	53
4.5.3	Statistická data.....	55
4.5.4	Srovnání obsahu rutinu ve větvičkách a v listech.....	55
4.5.5	Srovnání bezu černého s významnými zdroji rutinu .....	56
4.5.6	Srovnání bezu černého s významnými zdroji rutinu na základě literatury .....	58
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>61</b>
<b>6</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....</b>	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....</b>	<b>70</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM PŘÍLOH .....</b>	<b>71</b>
<b>9</b>	<b>PŘÍLOHY</b>	

# 1 ÚVOD

*Sambucus nigra* L., bez černý, je významnou léčivou rostlinou používanou v lidovém léčitelství snad od nepaměti. Všechny jeho části jsou známy pro své léčivé vlastnosti už z doby Hippokratovy. Ve středověku se o bezu černém psalo jako o bylině kouzelné, která byla velmi uctívána z důvodu léčby mnoha nemocí. Patří do čeledi zimolezovitých a kromě našeho území roste po celém mírném a subtropickém pásmu.

Mimo rozšířený planý bez jsou v poslední době zakládány sady se šlechtěnými odrůdami bezu černého s cílem uznání bezu jako ovocnářské odrůdy v ČR. S dobou šlechtění ubývá množství nebezpečného sambunigrinu obsaženého ve velkém množství v planém bezu. Tyto šlechtěné odrůdy, přesněji jejich plody a květy, jsou využívány pro farmaceutické a potravinářské účely. Bezinky mají široké uplatnění pro přípravu marmelád, džemů, povidel, kompotů, vín a dalších. Větvičky a listy bezu černého jsou každoročně stříhány pro omlazení keřů pro schopnost dostatečného vyživení všech částí rostliny a v současné době jsou brány jako odpadní materiál, a jako takové bývají kompostovány. Aby mohly být tyto části bezu černého využity ku prospěchu lidí, když se ví o pozitivních účincích květů a plodů na lidské zdraví, jsou stanovovány obsahové látky v těchto částech šlechtěných odrůd a porovnávány s významnými zdroji těchto obsahových látek. Pak je možné tyto části rostliny v případě pozitivních naměřených hodnot použít například jako zdroj biologicky účinných látek, doplňků stravy a nebyly zkompostovány.

Pozitivní vliv bezu černého na lidský organismus je přisuzován přítomnosti farmakologicky účinným bioflavonoidům, z nichž nejvýznamnějším je rutin. Rutin, někdy nazývaný vitamínem P, je nejčastěji se vyskytující glykosidickou formou kvercetinu. Tato látka je rostlinami syntetizována jako obrana vůči ultrafialovému záření a chorobám. Rutin jako sekundární metabolit vyšších rostlin se používá k léčení zvýšené lomivosti a propustnosti krevních vlásečnic způsobených různými chorobami. Velmi významná je jeho antioxidační účinnost, tedy schopnost působit proti volným radikálům.

Prvním krokem při analýze léčivých rostlinných složek je oddělení látek, které mají být analyzovány, z buněčné matrice. K těmto účelům se využívá např. Soxhletovy extrakce nebo macerace. Jsou to metody poměrně jednoduché, nicméně jejich nevýhodou jsou dlouhé doby extrakce, pracné ruční řízení, relativně vysoká spotřeba rozpouštědel nebo nevyhovující reprodukovatelnost metod. Výhodnější je využití zrychlené extrakce rozpouštědlem umožňující použít zvýšeného tlaku a teploty, jako je PSE (pressurized solvent extraction), PHWE (pressurized hot water extraction) nebo extrakce ultrazvukem. Analýzu vzorků lze uskutečnit např. pomocí s různými detektory jako třeba DAD, UV-VIS, MS anebo CZE (kapilární zónová elektroforéza).

Cílem diplomové práce je stanovit množství rutinu v listech a větvičkách devatenácti odrůd bezu černého, srovnat naměřené hodnoty s významnými zdroji těchto flavonoidů a posoudit, je-li možné odrůdy bezu černého zařadit mezi významné zdroje rutinu, zda by tyto méně prozkoumané části rostliny mohly být v budoucnu použity například pro přípravu zdraví prospěšných doplňků stravy, popřípadě ozdravných koupelí v lázních.

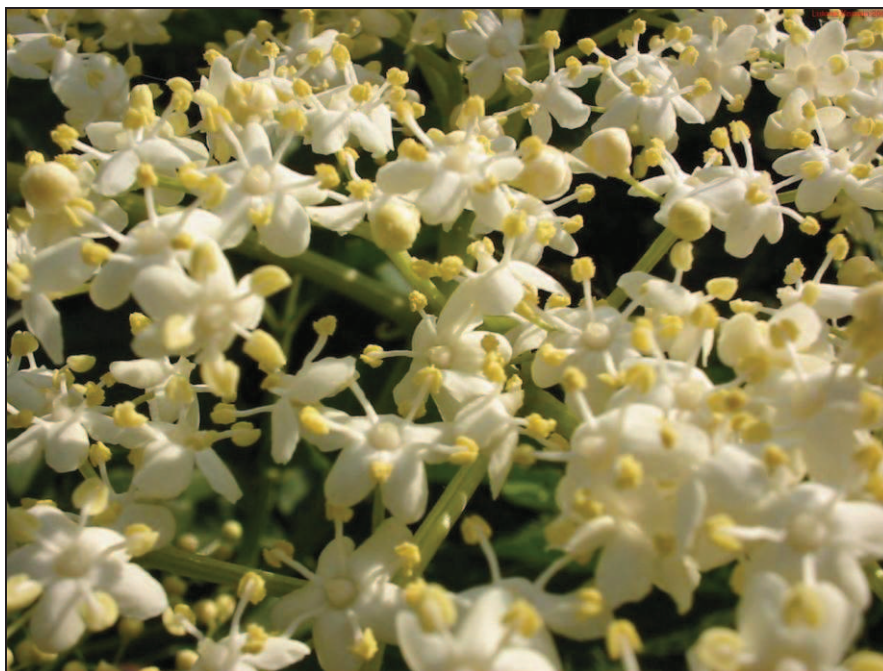
## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Bez černý

Bez černý, latinským názvem *Sambucus nigra* L., patří do čeledi zimolezovitých (*Caprifoliaceae*). Latinský název pochází pravděpodobně z řeckého slova „Sambux“ označující barvivo obsažené v plodech bezu a slova „niger“ odvozeného od černých plodů. Bez černý bývá také označován jako psí bez, bezinky nebo také smrdinky a kozičky.<sup>1</sup>

#### 2.1.1 Obecné znaky

Bez černý je keř nebo menší strom dosahující výšky 3 až 5 metrů, ale může dorůst až do výšky statného stromu kolem 10 metrů.<sup>3</sup> V našem podnebném pásu kvete od května do července. Bez má šedohnědou až šedou rozpukanou kůru, letorosty jsou dužnaté a sytě zelené.<sup>1</sup> Větve bezu jsou vyplněné bílou, vatovitou dřevinou. Malé větve jsou zelené barvy, později se barví do šedé a mají nápadné čokkovité jizvy.<sup>4</sup> Na jaře má bez bílé květy uložené do složeného okolíku. Květy (Obr. 1) mají velikost od dlaně do dezertního talíře.<sup>1</sup> Mají výraznou až nepříjemnou vůni, která se usušením zjemní a je příjemná. Celé okolíky se sbírají v červnu a červenci na přípravu různých surovin, po jejich odkvetení dozrají bobulovité peckovice černofialové barvy, které jsou jedlé a příjemně voní.<sup>3</sup> Plody (Obr. 2) dozrávají v srpnu až září, mají asi 6 mm v průměru. Listy raší již v dubnu.<sup>1</sup> Jsou lichozpeřené, řapíkaté, vstřícně postavené, s dvěma až třemi jařmy lístků, které jsou zubaté a páchnoucí po rozemnutí.<sup>4</sup>



Obr. 1 Květy bezu černého<sup>2</sup>



Obr. 2 Plody bezu černého<sup>2</sup>

### 2.1.2 Výskyt

Bez černý je rozšířený po celé Evropě, roste na Kavkaze, v Malé Asii, v Arménii, v Íránu a zasahuje až do západní Sibíře.<sup>5</sup> Je jedním z nejméně náročných keřů. Nevyhovují mu vápenité půdy a vyhledává půdy bohaté na dusík a humus, vlhké. Nevadí mu ani stinná, ani slunečná místa. U nás roste téměř všude, původně se vyskytoval zejména v lužních lesích na záplavové půdě, pobřežních křovinách. Nejlépe se mu daří ve vlhkých, lesnatých půdách. Je ho vidět i v okolí vodních toků, v roklinách, na kamenitých místech.<sup>1, 6</sup> Výzkumy ukázaly, že bez černý není citlivý na znečištěné ovzduší, proto je užitečný pro pěstování ve městech na rušných ulicích. Bez černý tak vytváří vynikající světelný efekt a zároveň přispívá ke zlepšení celkového ovzduší.<sup>1</sup>

### 2.1.3 Bez černý jako droga

Droga se používá většinou ve své sušené podobě, proto se jednoduše označuje jako sušenou část rostliny.

Sbírají se květenství, která poskytují oficiální drogu *Flos sambuci*. V době květu se odstřihují nůžkami a volně ukládají do košíků, aby se nezapařila. Obvykle se suší celá květenství na šňůrkách. Správně usušená květní droga má nažloutlou barvu, charakteristický pach. Droga musí být uchována v dobře uzavřené nádobě.

Pro domácí užití a potřeby potravinářského průmyslu se sbírají plodenství známá jako bezinky, poskytující drogu *Fructus sambuci*. Dozrávají od července do září. Suší se nejprve na slunci a pak se dosouší umělým teplem do scvrknutí. Dobře usušené plody mají leskle černofialovou barvu, jsou bez pachu s nakysle sladkou, svíravou chutí. Kvalitní droga musí obsahovat co nejméně nedozrálých nebo znehodnocených plodů.

Bezové listí *Folia sambuci* se sbírá v době od dubna do října, suší se v místnosti s dostatečným přístupem čerstvého vzduchu. Jejich účinek se sušením snižuje.

Bezová kůra *Cortex sambuci* se sbírá převážně pro lékařské účely z mladých výhonků v září a říjnu. Suší se ve stínu při umělé teplotě maximálně 40 °C. Kůra má stejně jako listy močopudné a projímavé účinky, avšak silnější.

Kořen *Radix sambuci* je ze všech drog nejsilnější. Pro léčebné účinky kořene je lepší použít přípravky z lékárny, neboť při sběru kořene se snadno poškodí celá rostlina. Používá se jako kloktadlo, při zácpě, či vodnatosti.<sup>1</sup>

#### 2.1.4 Obsahové látky

Z obsahových látek květu jsou nejvýznamnější glykosidy (sambunigrin, rutin), sliz, silice (0,03–0,14 %), třísloviny, fenolkarboxylové kyseliny (p-kumarovou, kávovou, ferulovou) aj.

Hlavní předností plodů je vysoký obsah vitaminů skupiny B a vitamin C (0,03 %), dále obsahují silice (0,01 %), flavonoidy, anhtokyany (0,2–1 %), třísloviny (3 %), kyanogenní glykosidy, organické kyseliny, sacharidy (7,5 %), karoteny, minerální prvky.<sup>7</sup> Listy obsahují triterpenoidy, flavonoidy a karotenoidy. Bezová kůra obsahuje třísloviny, pryskyřice, žlutý olej a kyselinu valerovou.<sup>1</sup>

##### ***Esenciální oleje neboli silice***

Hlavní součástí aroma bezinkové šťávy je fenylacetaldehyd, který je obsažen prakticky ve všech esenciálních olejích. Tyto oleje regulují činnost jater a žlučníku. Jsou schopné zastavit rozmnožování bakterií.<sup>1</sup>

##### ***Glykosidy***

Jsou to rostlinné sloučeniny, které vznikají reakcí molekul cukru s fenolem, alkoholem či aminem. *Sambunigrin* je kyanogenní glykosid bezu černého, kyanogen schopný za určitých podmínek vytvořit kyselinu kyanovodíkovou. Nachází se v nezralých a syrových bobulích, jeho požití může vést ke zvracení a nevolnosti. Rozpadá se při zahřátí. Hotový bezový sirup ho obsahuje většinou v nepatrném množství. Při jeho výrobě dochází k lisování nezralých plodů. Zde je jeho množství nezávadné. Litř bezové šťávy obsahuje asi 0,0001% této kyseliny. Flavonovým glykosidem bezu černého je např. *rutin*, který působí příznivě na permeabilitu tělních kapilár.<sup>1</sup>

##### ***Barviva***

Barvivo bezu se nazývá *sambucyanin*. Díky jeho obsahu lze stanovit, zda se jedná o čistý bezový sirup. Toto barvivo bylo dříve označováno jako vitamin P. Květy bezu obsahují až 1,8 % flavonoidů, do jejichž skupiny *sambucyanin* patří.<sup>1</sup>

##### ***Třísloviny***

Jejich obsah v litru bezové šťávy se pohybuje kolem 4 mg. Interakcí proteinů slin s tříslovinami vzniká trpká až svíravá chuť. Třísloviny příznivě působí při zánětlivých procesech sliznice i kůže. Vyznačují se stahujícími, antimikrobiálními účinky. Jsou potřebné při vylučování těžkých kovů z těla.<sup>1</sup>

### ***Organické kyseliny***

Studie prokázala, že v plodech bezu černého byla v nejvyšší koncentraci obsažena kyselina citronová, dále jablečná, v nižší koncentraci pak kyselina šikimová a fumarová.<sup>8</sup>

### ***Sacharidy***

Bez černý obsahuje v největším množství monosacharidy glukosu a fruktosu.<sup>9</sup>

### ***Vitaminy***

Bez černý obsahuje vitamin A (retinol), B<sub>1</sub> (thiamin), B<sub>2</sub> (riboflavin), B<sub>3</sub> (niacin) a C (askorbová kyselina). Zvláště bohatý je na vitamin C, 100 g čerstvých plodů obsahuje až 18 mg vitamínu C. Je životně důležitý pro tvorbu kolagenu.<sup>1</sup>

### ***Minerální prvky***

Studie prokázala, že bezová šťáva obsahuje nejvíce draslíku, vápníku a sodíku.<sup>8</sup>

## **2.1.5 Pěstování, výsadba, rozmnožování, ošetřování a ochrana rostlin**

Potřeba květů a plodů z bezu černého se neustále zvyšuje a z volné přírody nelze toto množství pokrýt, je nutné pěstování a kultivace bezu ve větším množství. Výběr správné odrůdy je velmi důležitým předpokladem vysoké úrody. K významným patří odrůdy jako je např. Haschberg vyšlechtěná v roce 1965 známá nízkou náchylností k napadení škůdci, dále pak Sambu z roku 1977, která je známá pro výjimečně chutný sirup nebo např. odrůda Riese von Voßloch, která dává dvojnásobné množství plodů než ostatní odrůdy bezu. Bez černý je nenáročnou rostlinou téměř každé zahrady. Vhodným obdobím k výsadbě je počátek jara nebo podzim. Mladé rostlinky by se měly vysadit ve vzdálenosti cca 5 m, neboť rostou velmi rychle. Rozmnožování je také nenáročné, semínka plodů se zasejí do prokypřené vlhké půdy, která je obohacená humusem. Popřípadě lze rozmnožování provést výsadbou řízků. Bez svou výraznou vůní přitahuje smyslově vysoce vyvinuté druhy hmyzu, které opylováním k rozmnožování přispívají. Bez poskytuje květy, plody i dřevo, přičemž nevyžaduje vlastně žádnou výraznou péči. Po sklizni plodů je však nutné staré větve ořezat, čas od času bez vyžaduje přihnojení nebo mulčování posekanou trávou či kůrou stromů. K nepřátelům bezu černého patří hraboš polní, virová onemocnění a mšice na listech, jejichž likvidace a prevence by se měla provádět přirozenými způsoby a metodami.<sup>1</sup>

## **2.1.6 Využití v lékařství**

V současné době se sbírají především květy (*Flos sambuci*) a plody (*Fructus sambuci*) bezu černého. Listy se dříve používaly na výrobu tzv. zelené masti na pohmožděniny, rány, otoky, ale dnes už se nepoužívají, protože při použití listů se zjistily negativní účinky způsobené otravou sambunigrinem, který je přítomen v malém množství i v květenství. Stejně tak lidové léčitelství používá někdy kůru, která stejně jako listy vyvolává zvracení a silné průjemy. Jejich zápach odpuzuje však některé škůdce a hlodavce. Květní droga je součástí čajů na nachlazení. Má potopudný účinek, který je velmi významný, dále i účinky slabě močopudné a projímavé. Bezinky se sklízí v celých plodenstvích, suší se a pak odstopkovávají na sítech. Tyto plody se používají v lidovém léčitelství, na výrobu bezinkového vína, dnes jako surovina pro výrobu kompotů, džemů, sirupů apod. Dále

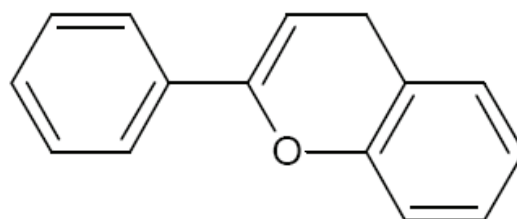
jsou používány při onemocnění nervového původu, při migrénách, proti křečím, kašli atd. Bez černý má mnoho léčebných účinků, které jsou připisovány přítomným flavonoidům.<sup>4, 10</sup>

## 2.2 Flavonoidy

Albert Szent-Györgyi byl významný maďarský biochemik, kterému je připisován objev flavonoidů. V roce 1936 spolu s Istvánem Ruzsnyákem potvrdili, že v rostlinách hrají důležitou esenciální úlohu, přičemž v lidském těle působí jako vitaminy. Szent-Györgyi prokázal tedy existenci redukujících látek v rostlinných pletivech i živočišných tkáních a izoloval z nadledvinek redukující látku, kterou známe jako kyselinu askorbovou, vitamin C.<sup>11</sup>

### 2.2.1 Chemická struktura flavonoidů

Flavonoidy též flavonoidní látky jsou rozsáhlou skupinou rostlinných fenolů obsahujících v molekule dva benzenové kruhy spojené tříuhlíkatým řetězcem v uspořádání C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. Flavonoidy jsou odvozeny od kyslíkaté heterocyklické sloučeniny 2H-chromenu substituovaného v poloze C-2 fenylovou skupinou, který se nazývá flavan. Strukturu flavanu tvoří dvě benzenová jádra spojená heterocyklickým pyranem.<sup>9</sup>



*Flavan*

Podle stupně oxidace C<sub>3</sub> řetězce a jeho substituce rozeznáváme základní struktury flavonoidů (Obr. 4):

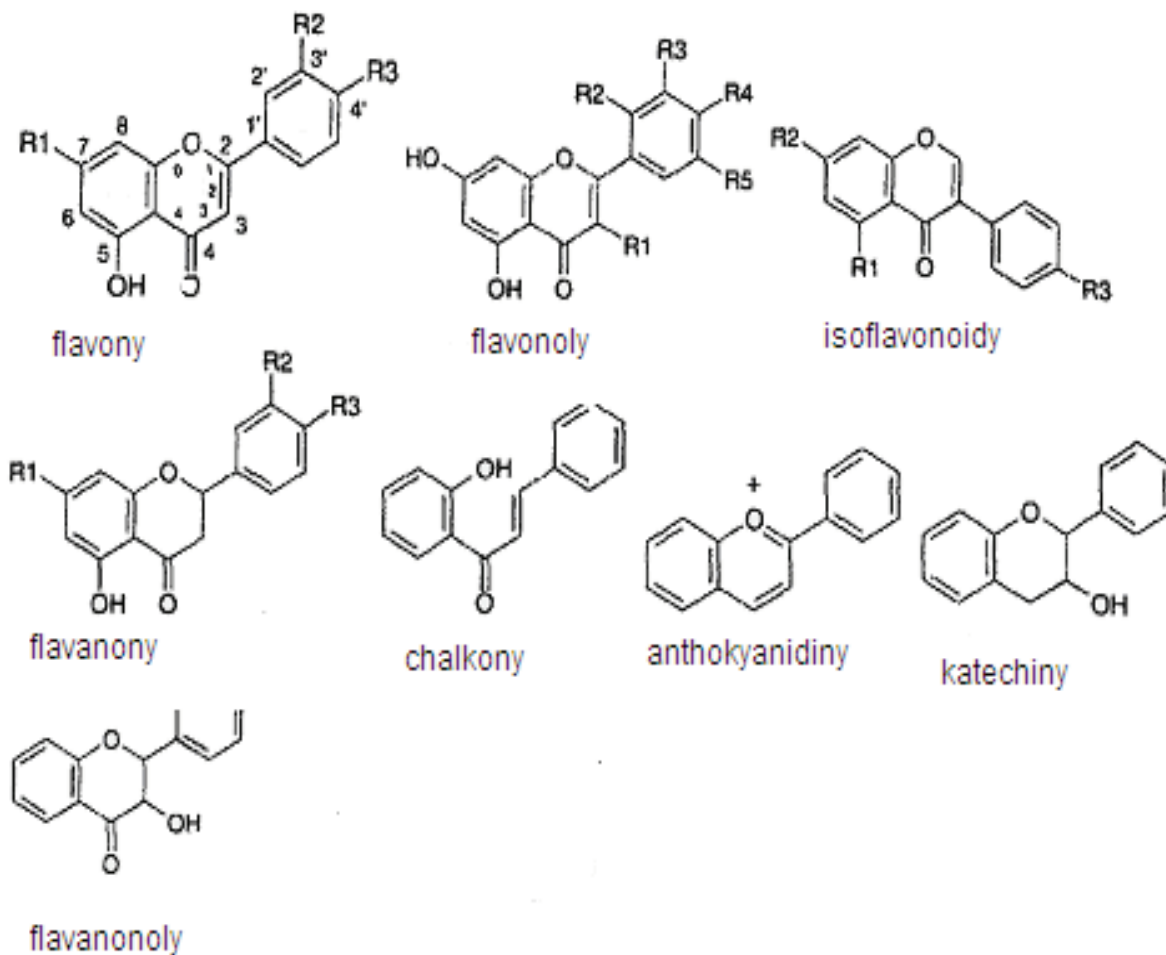
- Katechiny
- Leukoanthokyanidiny
- Flavanony
- Flavanonoly
- Flavony
- Flavonoly
- Anthokyanidiny

Běžně bývají všechny tři kruhy substituovány hydroxyskupinami nebo methoxyskupinami a jednotlivé deriváty se liší stupněm oxidace a substituce.<sup>12</sup> V přírodě jsou pravděpodobně nejrozšířenější flavonoly.<sup>9</sup>

Ze strukturně příbuzných sloučenin, u kterých jsou dva kruhy spojeny alifatickým C<sub>3</sub> řetězcem nebo řetězcem, který je částečně součástí uranového cyklu, se dále rozeznávají (Obr. 3):

- Chalkony
- Dihydrochalkony
- Aurony

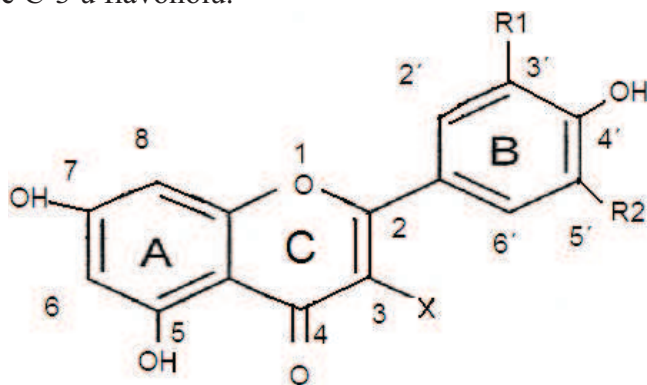
Méně běžné substituenty 2H-chromenu v poloze C-3 fenylovou skupinou se nazývají isoflavonoidy a pokud je spojení v poloze C-4, jsou sloučeniny odvozené od neoflavanu a nazývají se neoflavonoidy.<sup>9</sup>



Obr. 3 Struktury hlavních flavonoidů<sup>13</sup>

Všechny barevné flavonoidy se dříve dělily podle barvy na dvě skupiny. Na červené až modré anthokyaniny (anthokyaniny) a žluté anthoxanthiny. Potravinářsky významnými isoflavonoidy jsou pouze isoflavony.<sup>9</sup>

Uhlíkové atomy v C a A kruzích se číslují od 2 do 8, v kruhu B od 2' do 6' (Obr. 4). Tato základní struktura umožňuje množství variací substitučních i strukturních ve všech třech kruzích.<sup>14</sup> Nejrozšířenějšími flavonoidy jsou tři flavonoly (kvercetin, kemferol a myricetin) a dva flavony (luteolin a apigenin). Rozdíl mezi flavonoly a flavony je přítomnost hydroxyskupiny v poloze C-3 u flavonolů.<sup>15</sup>



Obr. 4 Struktura flavonoidů<sup>14</sup>

Flavonoidy se vyskytují běžně ve formě O-glykosidů obsahujících ve své molekule necukernou složku tzv. aglykon (tedy část molekuly bez cukru) a cukernou složku vázanou nejčastěji v poloze C-3. Nejčastěji se jako cukerná složka vyskytuje D-glukosa, dále pak například D-galaktosa, L-arabiosa, D-xylosa a další.<sup>16</sup> Téměř všechny glykosidy jsou substituovány v poloze C-3 a nejhojnější jsou deriváty kvercetinu.<sup>17</sup>

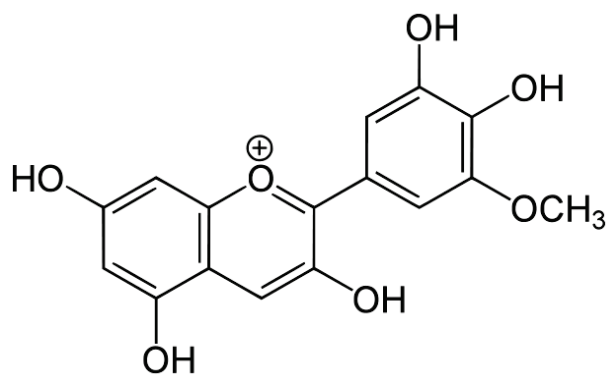
## 2.2.2 Zdroje flavonoidů

Z důvodu neschopnosti syntetizovat aromatické sloučeniny s benzenovým kruhem z alifatických prekurzorů jsou zvířata i lidé nuceni přijímat tyto organické antioxidanty v potravě.<sup>18</sup>

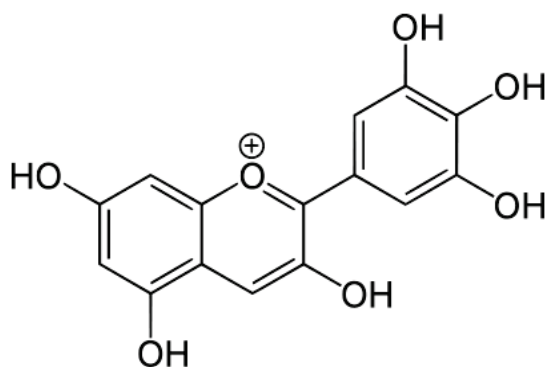
Dnes je známo přes 4500 flavonoidních látek v různých rostlinných zdrojích, hlavně v nadzemních částech jako jsou listy, květy, pyl, méně často kořeny, semena, kůry a plody a stále se nacházejí další sloučeniny.<sup>19</sup> Některé flavonoidy jsou důležité jako přírodní rostlinná barviva, jiné jsou významné pro svou chuť a biologické účinky.<sup>9</sup>

V ovoci a zelenině se nejčastěji setkáváme se skupinou anthokyanů díky nimž má ovoce a zelenina atraktivní oranžovou, červenou, fialovou a modrou barvu. Hlavními zdroji využívanými jako potraviny jsou plody rostlin čeledi révovitých (*Vitaceae*, hrozny révy vinné) a růžovitých (*Rosaceae*, třešně, švestky, maliny, jahody, jablka, hrušky aj.). Další potravinářsky významné rostliny, které obsahují anthokyanová barviva, patří do čeledi lilkovitých (*Salonaceae*, lilek a odrůdy brambor s červenou slupkou), do čeledi srstkovitých (*Grossulariaceae*, červený a černý rybíz), vřesovcovitých (*Ericaceae*, borůvka a brusinka), olivovitých (*Oleaceae*, olivy) a brukvovitých (*Brassicaceae*, ředkvičky).<sup>20</sup>

Anthokyaniny jsou glykosidy různých aglykonů. Tyto aglykony se nazývají anthokyanidiny. V potravinářství má větší význam pouze skupina anthokyanidinů s hydroxylovou skupinou v poloze C-3. Do této skupiny patří kyanidin, pelargonidin, peonidin, petunidin, malvidin, delfinidin.<sup>9</sup>



*Petunidin*



*Delphinidin*

Kromě anthokyanů patří k nejvýznamnějším flavonoidním barvivům žlutě zbarvené flavony a flavonoly. Mezi flavonoly patří např. kvercetin, kaempferol a myricetin, které se vyskytují hlavně jako glykosidy a jako kopigmenty doprovázejí anthokyany. Vysoký obsah kvercetinu se nachází ve slupce červených odrůd cibule. Nejrozšířenější glykosidy jsou odvozené především od kvercetinu a kaempferolu. Běžným glykosidem je rutin.<sup>20</sup> Na bobulích bezu černého se nachází kvercetin-3-rutinosid a kvercetin-3-glykosid. Dalšími zdroji flavonoidů je čokoláda, čaj, sója, obilniny, papája a jiné, kde je obsažen především flavonol kvercetin a kemferol.

Přítomnost těchto flavonoidů v ovocných šťávách je využívána k průkazu jejich falšování.<sup>9</sup>

### 2.2.3 Vlastnosti flavonoidů

Flavonoidy patří mezi sekundární rostlinné metabolity. V rostlinách hrají důležitou roli jako obranné a signální molekuly při rozmnožování, patogenesi nebo symbióze. Rostlinné flavonoidy jsou nezbytné v obranných mechanismech proti stresu způsobenému UV-B zářením, mikrobiální infekcí aj.<sup>13</sup>

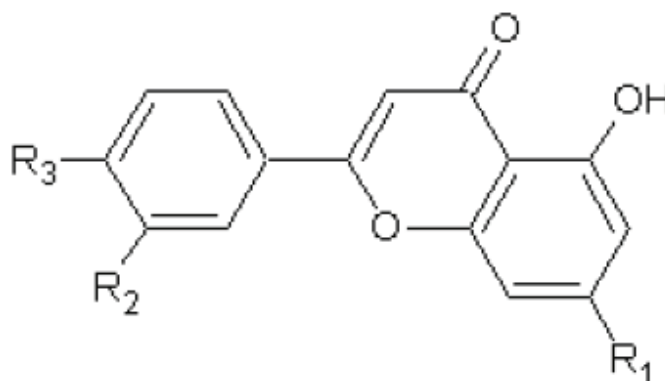
Flavonoidy jsou součástí antioxidačního systému s mnoha zdraví prospěšnými účinky. Antioxidační aktivita, která ovlivňuje oxidaci volných radikálů, zabráňuje peroxidaci lipidů, tvoří komplexy s některými ionty kovů a tím je inaktivuje. Mají tedy chelatační účinky vůči kovům, které by mohly ve volné formě zvýšit počet reaktivních forem kyslíku.<sup>21, 22</sup> Antioxidační aktivita je závislá na počtu a poloze hydroxylových skupin v molekule a na jejich glykosylaci. Významné radikálově likvidační vlastnosti mají díky struktuře

flavonoly (Obr. 6) jako je kvercetin, kaempferol, myricetin a flavony (Obr. 5) jako je apigenin a luteolin. Likvidační vlastnosti spočívají v redukci radikálů a aktivních sloučenin kyslíku jako je peroxid vodíku, superoxidový radikál, hydroxylové radikály a jiné a radikály oxidu dusného.<sup>19, 23</sup> Radikály flavonů a flavonolů jsou uvedeny v Tab. 1 a Tab. 2.

Studie ukazují, že příjem potravin obsahujících flavonoidy může chránit organismus před některými formami rakoviny. Flavonoidy mohou také působit proti vzniku krevních sraženin a tím snižovat riziko infarktu myokardu nebo mozkové mrtvice.<sup>12</sup> Dále bylo prokázáno jejich působení proti alergiím, zánětům a virům. Pomáhají předcházet oxidaci lipoproteinů nízké hustoty a tím snižují riziko vzniku atherosklerózy.<sup>24</sup> Podporují odolnost krevních vlásečnic postižených například při vysokém krevním tlaku nebo cukrovce, jsou to látky příznivě upravující metabolismus lidí ve vysokém věku. Některé flavonoidy vykazují příznivý močopudný a antiseptický účinek.<sup>25</sup>

Tab. 1 Radikály flavonů a jejich molekulární hmotnosti<sup>13</sup>

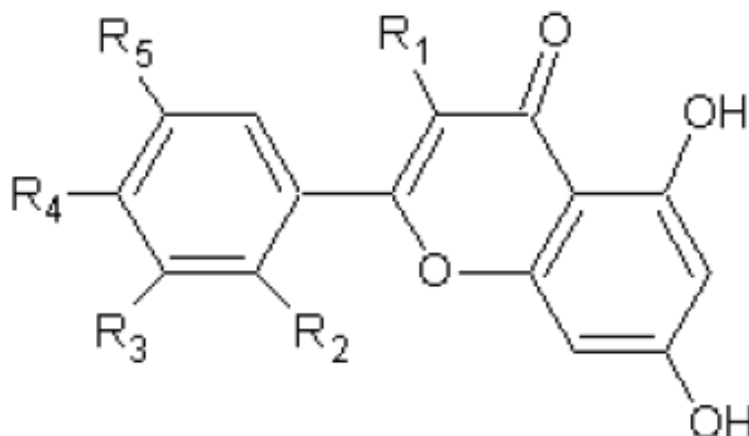
Flavony	R1	R2	R3	M
Apigenin	OH	H	OH	270
Luteolin	OH	OH	OH	286



Obr. 5 Strukturální vzorec flavonu<sup>13</sup>

Tab. 2 Radikály flavonolů a jejich molekulární hmotnosti<sup>13</sup>

Flavonoly	R1	R2	R3	R4	R5	M
Kvercetin	OH	H	OH	OH	H	302
Kemferol	OH	H	H	OH	H	286
Myricetin	OH	H	OH	OH	OH	318
Rutin	3-O-Rha-glu	H	OH	OH	H	610



Obr. 6 Strukturní vzorec flavonolu<sup>13</sup>

## 2.2.4 Kvercetin

### 2.2.4.1 Obecné vlastnosti a výskyt

Kvercetin je prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v acetonu a methanolu. Je doporučeno chránit ho před světlem.<sup>26</sup> Kvercetin bývá součástí doplňků stravy i přesto, že nepatří k nedostatkovým látkám ve výživě. Účinek kvercetinu z potravin je výraznější než při jeho příjmu v čisté formě.<sup>27</sup>

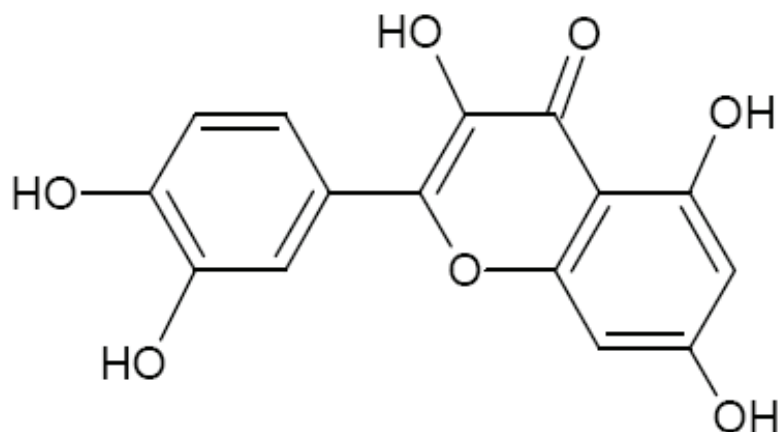
Jeho zdrojem je cibule, jablka, kapusta, červené víno, zelený a černý čaj, ořechy, květák, kapusta. Vysoké množství se nachází i v borůvkách a olivovém oleji.<sup>23</sup>

### 2.2.4.2 Farmakologické účinky

Kvercetin je jedním z nejrozšířenějších a nejsilnějších biologicky aktivních flavonoidů. Poprvé byl izolován z vnitřní kůry dubu *Quercus velutina*. Jde o žlutý prášek, který působí preventivně proti rakovině, zejména rakovině prostaty, působí proti zánětům, kardiovaskulárním onemocněním, proti bakteriím a virům. Dále působí proti trombóze a pomáhá bránit vzniku krevní sraženiny. Zabraňuje poškození cév volnými radikály a oksyloženým cholesterolem LDL, čímž napomáhá volnému průchodu cév. Velmi významná je jeho schopnost tlumit alergické reakce. Kvercetin také redukuje hladinu glukózy v krvi a zlepšuje hladinu inzulínu, je tedy vhodnou prevencí proti nemocem spojených s obezitou, k léčbě kardiovaskulárních onemocnění u pacientů s Diabetes mellitus nebo s dýchacími obtížemi. Bylo zjištěno zlepšení funkce plic a snížení rizika např. astmatu nebo bronchitidy u lidí s vysokým příjmem jablek, která jsou bohatá na kvercetin. Některé studie naznačují, že může být prospěšný při hubnutí tím, že potlačuje vstřebávání sacharidů.

### 2.2.4.3 Absorpce v organismu

Vědci se dříve domnívali, že ke vstřebávání kvercetinu v lidském organismu nedochází, protože L-glykosidická vazba mezi sacharidem a flavonolem byla odolná proti hydrolýze pankreatickými enzymy. Avšak při studiích zabývajících se měřením fekálního kvercetinu bylo zjištěno, že k absorpci v organismu dochází. Bylo zjištěno vstřebávání kvercetin-L-glykosidu z cibule 52 %. Za stejných podmínek byla absorpce kvercetinu bez cukerných zbytků (aglykony) a kvercetin-L-rutinosidu okolo 20 %. Tyto výsledky ukazují vliv cukerných zbytků na vstřebávání kvercetinu v lidském organismu.<sup>28</sup>



*Kvercetin*

## 2.2.5 Rutin

### 2.2.5.1 Obecné vlastnosti a výskyt

Rutin nebo také vitamin P byl objeven při zkoumání účinků kyseliny askorbové při léčení křečových žil. Je nejčastěji se vyskytující glykosidickou formou kvercetinu.<sup>29</sup> Ve své struktuře obsahuje kvercetin a disacharid rutinosu (rhamnosa a glukosa). Rutin je žluté až zelenožluté barvy a tvoří jehličkovité krystalky. Množství rutinu v rostlinách je velmi závislé na UV záření. Čím je více UV záření, tím více rutinu se nachází v daných rostlinných zdrojích. Rutin je málo rozpustný ve vodě a líhu, prakticky nerozpustný v etheru, ale dobře rozpustný v roztocích alkalických hydroxidů a v amoniaku. Při skladování je nutné ho chránit před světlem.<sup>30</sup>

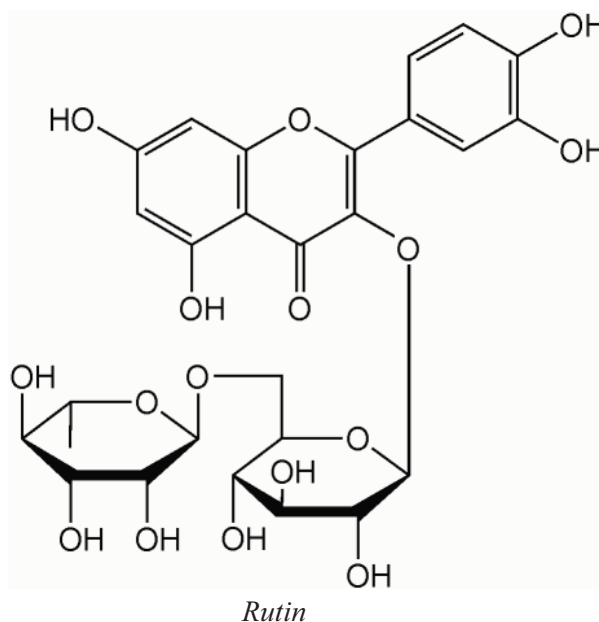
Významným zdrojem rutinu je pohanka, dále pak ovoce a zelenina. Bývá však obsažen i v cibuli, citrusových plodech, černém čaji, v červeném víně aj.<sup>23, 30</sup>

### 2.2.5.2 Farmakologické a biologické účinky

Tento flavonol má silné antioxidační, protikarcinogenní a protizánětlivé účinky, má pozitivní vliv na pružnost a permeabilitu krevních kapilár. Reduje Fentonovu reakci, při které dochází k produkci škodlivých radikálů kyslíku a zintenzivňuje účinky vitamínu C.<sup>30</sup> Rutin urychluje hojení ran, používá se při léčbě hemeroidů.<sup>31</sup>

Používá se také ve farmaceutických preparátech a potravinových doplňcích, protože zvyšuje s dalšími flavonoidy hladinu kyseliny askorbové v živočišných orgánech, dále pak k prevenci krvácení a praskání kapilár a pojivové tkáně.<sup>9</sup> Jeho protizánětlivé

schopnosti byly prokázány v celé řadě studií na zvířatech. Ukázalo se, že rutin zvyšuje úroveň glutathionu v tračníku, čímž snižuje oxidační poškození tkáně při tomto zánětlivém procesu.<sup>29</sup>



### 2.2.6 Rutin jako doplněk stravy

Podle zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích, ve znění pozdějších předpisů, jsou doplňky stravy potraviny, jejichž účelem je doplňovat běžnou stravu a které jsou koncentrovanými zdroji vitaminů a minerálních látek nebo dalších látek s nutričním nebo fyziologickým účinkem, obsažených v potravine samostatně nebo v kombinaci, určené k přímé spotřebě v malých odměřených množstvích.

Doplňky stravy se uvádí do oběhu pouze balené, upravené do formy kapslí či tobolek, pastilek a jiných forem určených pro příjem v malých odměřených množstvích. Dříve se doplňky stravy řadily mezi potraviny pro zvláštní výživu, od 15. února 2004 nepatří do této kategorie. Mají samostatnou vyhlášku č. 225/2008 Sb., kterou se stanoví požadavky na doplňky stravy a na obohacování potravin.<sup>32</sup>

V současné době je na trhu dostupné nespočetné množství doplňků stravy obsahujících rutin, ať už prodejných v lékárnách, nebo v obchodech s potravinami. Většinou se jedná o komplexní doplňky stravy, které obsahují vedle rutinu také například vitaminy C, A, E, vitaminy skupiny B, beta karoten, ubichinon Q 10, kyselinu listovou, minerály a další. Jednotlivé obrázky doplňků stravy (Tab. 3) jsou uvedeny v příloze P 1.

Tab. 3 Rutin jako doplněk stravy<sup>33, 34</sup>

Název	Složení
<b>Chondrotin MSM 2600</b>	taurin, vitamin E a selen, rutin a vitamin C
<b>Celaskon limetka</b>	vitamin C 180 mg + Rutin 30 mg
<b>GS Extra C Multivitamin</b>	rutin, vitamin C

---

<b>Geriastim</b>	vitamin A, C, D2, E, vit. skupiny B, kyselina pantotheová, rutin, lecitin atd.
<b>Betavital</b>	extr.červené řepy s rutinem, 150ml
<b>Hemodin</b>	30 tbl, komplex bioflavonoidů s klinicky ověřeným účinkem při léčbě akutní i chronické formy hemeroidů
<b>Koenzym Q10 + Rutin 60 kapslí</b>	rutin 60 kapslí
<b>Rutas</b>	30 tablet, vitamin C a rutin
<b>Natures Bounty Rutin</b>	rutin 50 mg, 250 tablet
<b>kloubní výživa GELACYS</b>	L-cystinu, rutin a vitamin C.
<b>Ginkorutin</b>	Rutin
<b>Activin</b>	výtažek ze zrníček hroznů obsahuje čistou přírodní směs bioflavonoidů
<b>Coenzystar Q10</b>	60 tobolek
<b>Imuno C komplex</b>	60 tobolek, komplex citrusových bioflavonoidů, rutinu, výtažku ze šípků a jedinečného kvercetinu
<b>Apiglukan Imuni</b>	30 kapslí, lyofilizovaná mateří kašička z několika přírodních imunostimulátorů
<b>Apivitamin</b>	250 g, obsahuje srovnatelné množství přírodního vitaminu C jako 22,5 zralých citronů, bohatý na antioxidanty a bioflavonoidy
<b>Acerola vitamin</b>	100 g, přírodní zdroj vitaminu C v prášku s vitaminy A, B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9, E, minerály a flavonoidy
<b>Hema Bion Q 10 Super Extra</b>	koenzym Q 10, rutin
<b>Zianica phlogist</b>	200 ml, přírodní extrakt z bezu černého, meruzalky černé, mrkve a černé višně ve formě sirupu

---

---

<b>C vitamin a rutin</b>	100 mg, 60 tobolek
<b>C vitamin a rutin</b>	vitamin C 400 mg + 5 mg rutinu
<b>NB Rutin</b>	50 mg
<b>C vitamin a rutin se sukralosou</b>	60 tobolek
<b>Ascorutin</b>	glykosid rutin a kyselina askorbová
<b>Wobenzym</b>	vhodně sestavené enzymy
<b>Imupren tablety</b>	enzymy bromelin 60 mg, papain 60 mg a trypsin 5 mg, quercetin 9 mg a rutin 10 mg
<b>Duo Herz tablety</b>	omega 3 NMK 17 mg, koenzym Q 10 25 mg, vitamin E 6,5 mg, kyselina listová 400 µg, rutin 10 mg, lykopen 500 µg
<b>Diochi Diocel</b>	50 ml, z rostlin a éterických olejů
<b>Diochi Baktevir</b>	50 ml, z rostlin a éterických olejů
<b>Černý bez sirup – Sambucus Nigra</b>	620g sirup připravený z květu a plodu bezu černého, tanin, flavonoidy, kyselina listová, vit. A, B, C
<b>Černá rybíz</b>	500 mg, 67 tobolek, černý rybíz obsahuje velké množství vitamínu C, vitamíny skupiny B, karoten, rutin, pektin, železo
<b>Hesperutin</b>	60 tbl, vitamin C, bioflavonoid
<b>Vinum</b>	60 tbl, extrakt z vinných slupek, rutin, hesperidin, vitamin C
<b>Fin Avis</b>	extrakt z ovesných klíčků, vitaminy C, E, B, mangan, zinek, selen, vápník, fosfor, hořčík, železo, aminokyseliny, rutin, 50 ml
<b>Kaštanový gel</b>	130 ml, voda, glycerin, hydroxid sodný, močovina, rutin, benzyl alkohol, atd.
<b>Hemostop probio</b>	450 mg diosmin/hesperidin, 107 mg vitamin C, 100 mg inulin, 20 mg rutin, 3,4 mg vitamin E, 10 ug selen, tokoferol acetát, lactobacillus acidophilus, bifidobacterium bifidum, bifidobacterium longum, stearan hořečnatý, seleničitan sodný pentahydrát, želatina, oxid titaničitý
<b>Elactiv nexrutin*</b>	energetický nápoj

---

---

<b>Rutinol*</b>	průnikový gel na křečové žíly hematomy, 100 ml
<b>Ruticelit*</b>	50 ml, regenerační krém, rostlinná látka rutin a celá řada dalších flavonoidů

---

\*Rutin ve formě nápojů a krémů

### 2.2.7 Metabolismus flavonoidů

Játra a flóra tlustého střeva jsou dvě hlavní místa metabolismu flavonoidů.<sup>14</sup> Před absorpcí flavonoidů střevním epitelem je nutná, vzhledem k velikosti molekul polymerních flavonoidů, degradace na sloučeniny o nižší molekulové hmotnosti. Hydrolýza  $\beta$ -vazeb cukerných zbytků je katalyzována pankreatickými enzymy. B-endoglukosidasy (laktasa-phlorizin hydrolasa a nespecifický enzym), které byly izolovány z tenkého střeva, jsou schopné hydrolyzovat glykosidové vazby flavonoidů. Laktasa-phlorizin hydrolasa má dvě aktivní místa. Jedno z nich katalyzuje hydrolýzu galaktosidů (laktosa), druhé katalyzuje hydrolýzu glykosidů typu phlorizinu nebo některé glykosylované flavonoidy. Dimery i trimery jsou schopné přestupu přes epitel tenkého střeva. Katechiny jsou pravděpodobnými hlavními degradačními produkty flavonoidů.<sup>35</sup> Enterobakterie zřejmě hydrolyzují glykosidy flavonoidů ve slepém a tlustém střevě. Vzniklé aglykony jsou snadněji absorbovány epitelovými buňkami, kdy jejich lipofilnost usnadňuje přechod přes fosfolipidovou dvojvrstvu membrán. Velká část metabolitů může být vylučována žlučí, mohou být ještě hydrolyzovány a reabsorbovány střevními buňkami nebo vylučovány stolicí.<sup>36, 37</sup>

Metabolismus flavonoidů není však jednotný vzhledem k jejich nejednotné struktuře a široké distribuci v jídle.<sup>38</sup>

## 2.3 PSE extrakce

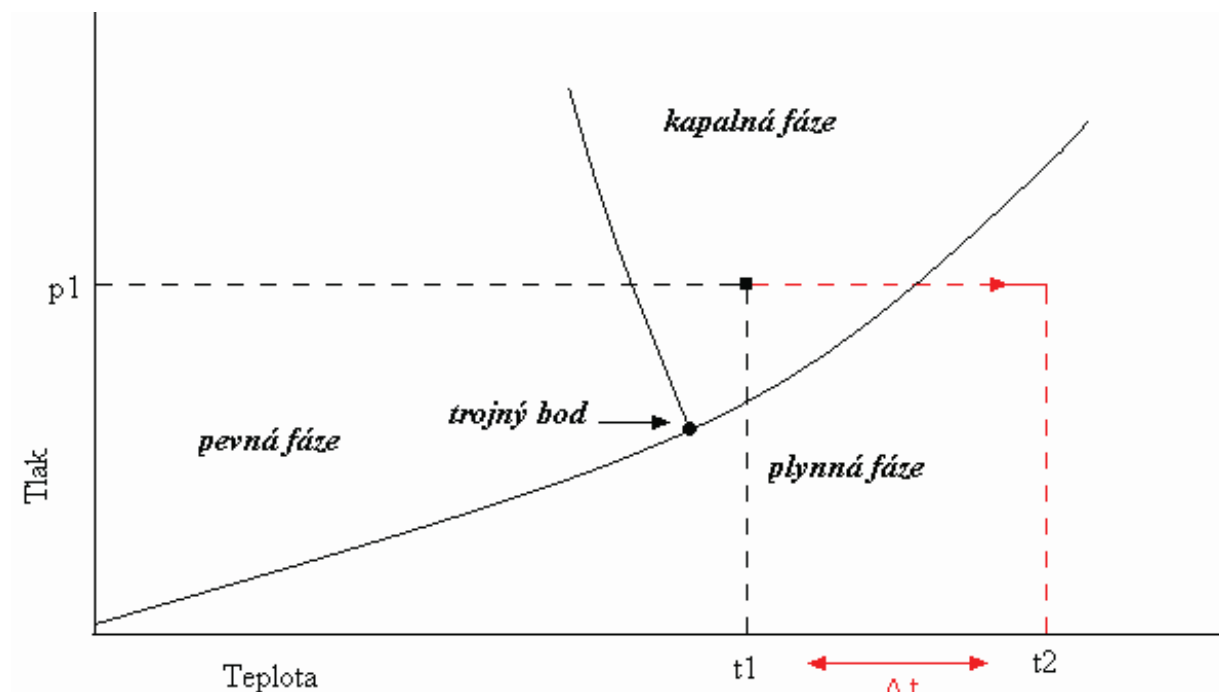
Extrakce je separační metoda, při které se uvolňuje složka ze směsi do rozpouštědla.<sup>39</sup> PSE (pressurized solvent extraction) je extrakce rozpouštědlem za zvýšeného tlaku a teploty, proto se řadí do skupiny extrakcí kapalinou. Tuto techniku můžeme najít pod různými názvy jako je např. zrychlená extrakce rozpouštědlem (ASE), kapalinová extrakce za zvýšeného tlaku (PFE), tlaková kapalinová extrakce (PLE) aj.<sup>40</sup> Techniky s těmito zkratkami označují prakticky totéž a jde o extrakce stlačenými organickými rozpouštědly za teplot nad bodem varu rozpouštědla neboli zrychlené extrakce.<sup>41</sup> Technika PSE je známá od roku 1996, kdy se začala využívat a nahrazovat tradiční extrakční techniky. Společností EPA (Enviromental Protection Agency) byla potvrzena pro extrakci vzorku z pevných matic a označena EPA 3545, proto se používá na získávání látek nerozpustných nebo částečně rozpustných ve vodě.<sup>40</sup>

### 2.3.1 Princip PSE extrakce<sup>42</sup>

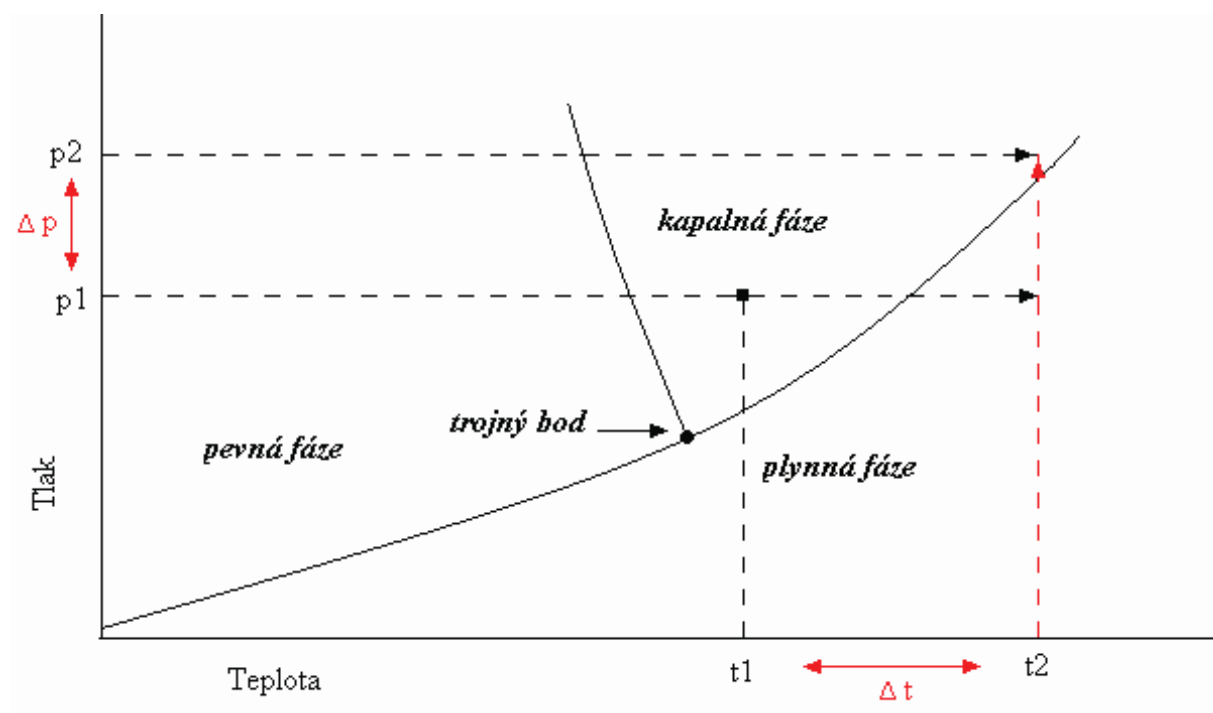
Principem metody je zvýšení extrakční účinnosti pomocí zvýšené teploty (Obr. 7) organického rozpouštědla. K tomu je zapotřebí také zvýšeného tlaku (Obr. 8), aby se rozpouštědlo udrželo v kapalném stavu a nepřecházelo do stavu plynného, kde klesá extrakční účinnost na nulu, což je nežádoucí. Při zahřívání dané látky v kapalném stavu se její

teplota zvyšuje, až dosáhne teploty varu. Po překročení této hodnoty teploty se kapalina mění na zmíněný plyn. Proto je potřeba zvýšit tlak působící na danou látku, aby se změnila opět z plynného stavu na kapalný.

V PSE technice se používá rozpouštědlo o vyšší teplotě, neboť čím vyšší teplotu kapalina má, tím má větší rozpouštěcí schopnost, tedy solvatační účinek.



Obr. 7 Trojfázový diagram, vliv zvýšené teploty na skupenství rozpouštědla<sup>40</sup>



Obr. 8 Trojfázový diagram, vliv zvýšeného tlaku na skupenství rozpouštědla<sup>40</sup>

### 2.3.2 Výhody PSE<sup>39</sup>

Metoda je užívána k extrakci výhradně tuhých vzorků a slouží ke zlepšení některých charakteristických vlastností kapalinových extrakcí za nízkých teplot a tlaků jako je rychlost extrakce, usnadnění automatizace a snížení spotřeby rozpouštědel.

PSE metoda má oproti klasickým extrakcím za nízkých tlaků jako je např. extrakce dle Soxhleta velké výhody:

- vyšší teplota při extrakci zvyšuje těkavost stanovovaných látek, a tím většinou i jejich rozpustnost v daném rozpouštědle, usnadňuje uvolnění analyzovaných látek z matrice vzorku
- vysoký tlak umožňuje vyšší penetraci rozpouštědla do vzorku tím, že udržuje rozpouštědlo nad bodem varu
- metoda šetří čas, spotřebu rozpouštědla
- rychlejší a efektivnější metoda ve srovnání s klasickými extrakcemi

### 2.3.3 Typy přístrojů pro tlakovou extrakci

Pro tlakovou extrakci rozlišujeme dva základní typy přístrojů. Prvním je přístroj One PSE, jde o jednomístné zařízení pro extrakci vzorku rozpouštědlem a druhým je později vyrobený Fast PSE, který představuje vícepozicové zařízení pro paralelní extrakci až šesti vzorků rozpouštědlem.<sup>39</sup>

#### 2.3.3.1 One PSE<sup>40</sup>

One PSE je automatizovaný a schopný extrakce tedy pouze jednoho vzorku v daném cyklu. U One PSE je komora pro vkládání vzorku seshora (Obr. 9).

Do nerezových ocelových patron (11, 22, 33 až 40 ml) se připraví vzorek matrice a vloží se do přístroje. V zásobníku přístroje musí být potřebné rozpouštědlo a vialka, do které je shromažďovaná vyextrahovaná látka. Doba extrakce se běžně pohybuje okolo 10 minut, ale může trvat od 1 až po 99 minut. Kapalina je do komůrky se vzorkem dávkována pomocí vysoce účinné pumpy, která je schopná dosáhnout tlaku až 15 MPa, tok rozpouštědla je obvykle 10 ml.min<sup>-1</sup>, extrakčním modulem je pec, která je schopna dosáhnout teploty od 50 do 200 °C.

Nutné je přečištění vzorku před extrakcí, které se provádí inertním plynem, např. dusíkem. Plyn musí být natlakovaný a přečištěný, ze vzorku odstraňuje zbytky kyslíku, které by mohly negativně ovlivňovat průběh extrakce.

Extrakci předchází optimalizace metody, která se skládá z nalezení vhodného extrakčního rozpouštědla, extrakční teploty, tlaku a doby působení rozpouštědla na matrici.



*Obr. 9 One PSE<sup>43</sup>*

### **2.3.3.2 Fast PSE**

Vylepšený přístroj Fast PSE (Obr. 10) umožňuje extrakci šesti vzorků naráz a je možné použít až čtyři různá rozpouštědla. Přístroj je schopný zaznamenávat data i ukládat nové metody do své paměti. Nadávkovaná rozpouštědla (až 4) se automaticky rozdělí do extrakčních nádob. Díky programovému vybavení v počítači je možné v reálném čase sledovat průběh extrakce, operace pumpy, stav každé pozice ventilu, teplotu zahřátých nádob a individuální tlak v každé z 6 nádob.

Přístroj je vybavený alarmem s automatickým zastavením chodu přístroje, který upozorní pracovníka například na chybějící nádobku v zásobníku na vzorky, chybějící vialku na sběr extraktů, únik rozpouštědla do ovzduší nebo proděravěné nádoby.<sup>40</sup>



*Obr. 10 Fast PSE<sup>39</sup>*

## 2.4 PHWE extrakce

Extrakce vodou za zvýšeného tlaku je svým principem velmi podobná PSE extrakci, rozdíl je však v používaném extrakčním rozpouštědle. Oproti organickým rozpouštědlům používaných při PSE technice se u PHWE k eluci látek z matrice používá voda. Voda má vysokou dielektrickou konstantu při pokojové teplotě a tlaku, proto nebyla považována za vhodnou k extrakci. Pokud je teplota vody zvýšena, dojde k poklesu permeability, viskozity i povrchového napětí, čímž se zvýší schopnost vody pronikat do matrice.<sup>44</sup> Má-li voda zůstat v kapalném stavu, musí být pracovní tlak při extrakci vyšší než tenze (tlak) nasycených par vody za příslušné teploty. Možnost využití stlačené horké vody k extrakci biologických materiálů je samozřejmě vždy podmíněna dostatečnou teplotní stabilitou příslušných cílových látek a jejich odolností vůči hydrolyze za podmínek extrakce. Katalytická aktivita některých kovů obsažených v konstrukčních materiálech extrakční cely (nerezová ocel, speciální slitiny) může vést k nežádoucím chemickým změnám extrahovaných látek. Kromě toho je ve všech aplikacích PHWE vždy nezbytné vodu před extrakcí důkladně zbavit rozpuštěného vzdušného kyslíku.<sup>45</sup>

Pod zvýšeným tlakem a teplotou dochází k desorpci látek v matrixu vzorku. Následuje difúze extrakční kapaliny do matrixu a rozdělení látek mezi matrix vzorku a extrakční kapalinou. V posledním kroku jsou látky eluovány do vialek.<sup>44</sup>

## 2.5 SPE extrakce

Extrakce pevnou fází je v současné době nejvýkonnější technika dostupná pro rychlou a selektivní přípravu vzorku, která se rozvíjí teprve přes 20 let. Podstatou SPE je zachycení molekul látky na tuhém sorbentu, přes který protéká vzorek. Při extrakci se využívá chemických vlastností molekul, které v důsledku mezimolekulových interakcí ulpívají na sorbetu. Mezi běžně uplatňované interakce patří van der Waalovy síly („nepolární“ interakce), vodíkové vazby a dipól-dipól interakce a kation-aniontové interakce.

Mezi výhody SPE extrakce patří především dobrá selektivita a úspora organických rozpouštědel. SPE lze snadno automatizovat a navázat na další instrumentální metody, proto se stala přednostně využívanou technikou úpravy vzorku. SPE lze využít pro čištění látek, zakoncentrování stopových množství látek a výměnu rozpouštědel. SPE extrakce se provádí za využití jednorázových SPE extrakčních kolonek o různých velikostech a náplních sorbentů.<sup>46</sup>

### 2.5.1 Princip SPE extrakce

Kapalný vzorek je veden přes SPE kolonku (Obr. 11) a sloučeniny jsou ze vzorku zachyceny materiálem sorbetu v koloně. Nežádoucí příměsi mohou být z kolonky selektivně odstraněny promytím správně zvolenými rozpouštědly. Žádoucí analyty jsou získány elučním rozpouštědlem v podobě vysoce čistého extraktu, který má často podstatně vyšší koncentraci analytu než měl původní vzorek. Naopak může být kolona vybrána k tomu, aby zadržovala příměsi ze vzorku a analyty nechala projít.<sup>46</sup>

### 2.5.2 Sorbenty

Kolonky SPE obsahují sorbety založené nejčastěji na bázi chemicky modifikovaných částic silikagelu. Sorbenty kladoucí odpor protékající kapalině jsou v kolonce uzavřeny

fritami z polyethylenu, případně oceli nebo polytetrafluorethylenu. Průtok kapalin přes kolonku je urychlován vakuem na výstupu z kolonky, tlakem na vstupu kolonky nebo centrifugací.<sup>46</sup>



Obr. 11 SPE extrakce a SPE kolonky<sup>46</sup>

### 2.5.3 SPE analýza potravin

SPE bývá hodně využívána v analýze potravin. Byla použita k čištění cholesterolu získaného z potravin obsahujících vejce po Soxhletově extrakci nebo po extrakci nadkritickou tekutinou.<sup>47</sup> Dále byla použita u ozářeného masa pro zadržení uhlovodíků vzniklých ozářením<sup>48</sup> nebo při rozdělení cis a trans mastných kyselin, kdy cis se zachytí na iontech stříbra a trans projdou.<sup>49</sup>

Její budoucnost je spjata s pokrokem v oblasti přípravy sorbentů, které mohou být více efektivní a selektivní.<sup>50</sup>

## 2.6 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Chromatografie je separační proces, kdy se látky rozdělují mezi dvě navzájem nemísitelné fáze, mobilní a stacionární, na základě fyzikálně-chemických interakcí, jako je adsorpce, rozdělování mezi dvě fáze na základě různé rozpustnosti, iontová výměna, biospecifické interakce (molekulové rozpoznávání) a síťový efekt.<sup>51</sup>

Adsorpční chromatografie s polárními adsorbenty jako stacionárními fázemi (nepolárními mobilními fázemi), tzv. chromatografie s normálními fázemi, historicky předchází chromatografii s nepolárními stacionárními fázemi. Adsorpční chromatografie s nepolární stacionární fází se nazývá chromatografie s obrácenými fázemi či reverzní chromatografie (reversed-phase chromatography, RP) a v dnešní analytické praxi je běžnější, protože ji lze aplikovat na širší okruh analytů a typů vzorků.<sup>39</sup>

### 2.6.1 Přednosti HPLC

HPLC (high-performance liquid chromatography) se vyvinula z plynové chromatografie v počátcích 70. let 20. století. Vysokých účinností se dnes dosahuje použitím stacionárních fází, které obsahují malé částice pravidelného tvaru a jednotné velikosti, které homogenně vyplňují kolonu. Průtok mobilní fáze je zajištěn vysokým tlakem, proto bývá tato metoda někdy nazývána vysokotlaká kapalinová chromatografie (high-pressure liquid chromatography).

Mezi výhody HPLC patří široká oblast použitelnosti, kdy lze analyzovat ionty, látky polární i nepolární, málo těkavé, tepelně nestabilní i vysokomolekulární. Další předností je možnost ovlivňovat separaci složením mobilní fáze, která není inertní (na rozdíl od GC), ale významně se na separaci podílí. Nevýhodou je náročnější instrumentace a složitější mechanismus separace ve srovnání s plynovou chromatografií.<sup>39</sup>

### 2.6.2 Chromatografická separace

Chromatografickou separaci látek v koloně lze provést třemi technikami: frontální, vytěšňovací, eluční. V současnosti se využívá technika eluční, kdy chromatografickým systémem protéká konstantní rychlostí kapalná mobilní fáze o určitém složení a fyzikálních vlastnostech, jejíž složky neinteragují se stacionární fází v koloně. Do mobilní fáze se nastříkuje vzorek a spolu s mobilní fází je unášen kontinuálně kolonou, ve které dochází k separaci na základě odlišných afinit ke stacionární fází, různé distribuci mezi mobilní a stacionární fází a rozdílné schopnosti a rychlosti migrace. Vzorky, které interagují silněji s mobilní fází než se stacionární, budou rychleji vymyty z mobilní fáze a rychleji dospějí k detektoru. Jejich retenční čas bude tedy nižší.<sup>52</sup>

Vymývání látek z kolony se nazývá eluce, proto se mobilní fází říká též eluční činidlo nebo eluent a schopnosti vymývat látky z kolony eluční síla. Čím rychleji jsou látky z kolony vymývány, tím má mobilní fáze vyšší eluční sílu.

Látky lze eluovat třemi způsoby:

- a) izokraticky (mobilní fáze o konstantním složení)
- b) skokem
- c) gradientem (eluční síla se podle určitého programu během separace mění)

Separace závisí na vlastnostech analyzovaných látek a jejich interakcích s mobilními a stacionárními fázemi, na složení mobilní fáze, typu a vlastnostech fáze stacionární, na parametrech kolony, dávkovacím zařízení, detektoru a spojovacích cestách, na průtoku mobilní fáze a pracovní teplotě.<sup>39</sup>

### 2.6.3 Stacionární fáze v HPLC

Rozhodující vliv na separaci při použití náplňových kolon má velikost a uspořádání částic. Čím jsou částice menší, tím je separace účinnější. Běžně se používají částice o velikosti 5 až 10  $\mu\text{m}$ , jsou k dispozici i náplně s velikostí částic pod 2  $\mu\text{m}$ . Separace je dále účinnější, pokud mají částice pravidelný (kulový) tvar, jednotnou velikost a kolona je jimi homogenně naplněna. Pro lepší separaci se používají monolitické stacionární fáze, kdy je kolona zcela vyplněna polymerem organického nebo anorganického původu o definované pórovitosti. Při analytických aplikacích se používají kolony délky 5–25 cm, průměru několik mm, objemu 1–20 ml a průtoku mobilní fáze 1  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ .<sup>39</sup>

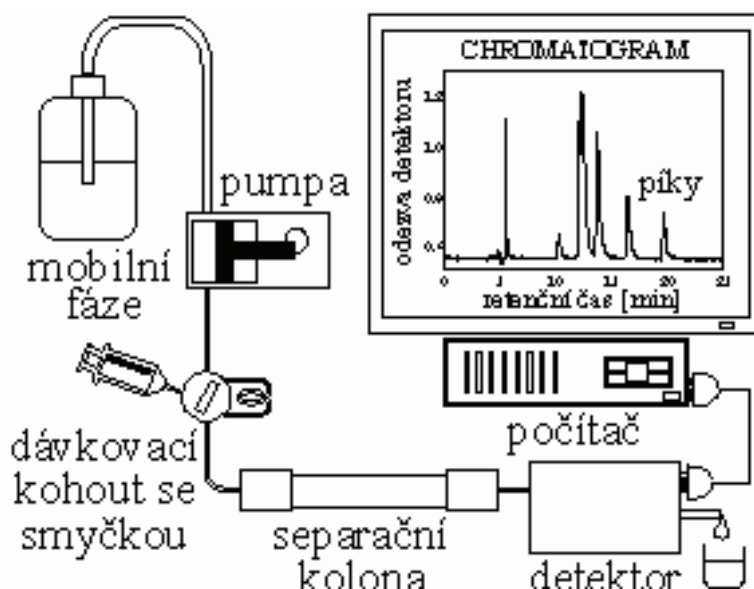
Novým typem stacionárních fází jsou vtištěné polymery, které jsou obdobou monolitických kolon, ale navíc je do náplně zabudován obtisk analytu, který chceme oddělit. Při přípravě polymeru v koloně se přidá analyzovaná látka a po ukončení polymerace se tento analyt vyjme z kolony. Zůstane po něm v náplni dutina charakteristická právě pouze pro něj (např. pro L-valin a D-valin se touto fází nezadrží).<sup>53</sup>

#### 2.6.4 Mobilní fáze v HPLC<sup>39</sup>

Mobilní fáze v kapalinové chromatografii není inertní, ale významně se podílí na separačním procesu. Změnit složení mobilní fáze je vždy jednodušší než použít jinou stacionární fázi a možnosti změny jsou prakticky neomezené. Složení mobilní fáze můžeme ovlivnit změnou složení rozpouštědel, změnou pH, iontové síly atd. Mobilní fáze je především charakterizovaná polaritou a selektivitou. Polarita je schopnost rozpouštědla podílet se na polárních interakcích, selektivita je definovaná jako relativní retence dvou sousedních látek. Mobilní fáze by měla v detektoru dávat minimální signál, tím umožňovat co nejcitlivější detekci solutů.

#### 2.6.5 Instrumentace V HPLC<sup>51</sup>

Kapalinový chromatograf (Obr. 12) se skládá ze zásobníku mobilní fáze, čerpadla, dávkovacího zařízení, kolony, detektoru, vyhodnocovacího zařízení. Odplyněná mobilní fáze se ze zásobníku přivádí přes filtr do vysokotlakého čerpadla, které ji dopravuje do kolony. Odplynění je důležité, aby se v detektoru v důsledku velkého tlakového spádu v systému netvořily bubliny. K odplynění se používá podtlak, ultrazvuk či probublávání heliem. Na výstupu kolony se nachází detektor, jehož signál je zpracován počítačem. Někdy systém obsahuje zařízení na derivatizaci, neboť je nutné převedení složek vzorku na deriváty. Řada vzorků obsahuje balastní látky, proto je nutné zařadit do systému předklonu na zachycení těchto látek. Jednotlivé části kapalinového chromatografu jsou propojeny spojovacími kapilárami nejčastěji z nerezové oceli.



Obr. 12 Schéma kapalinového chromatografu<sup>52</sup>

### ***Zásobník mobilní fáze<sup>53</sup>***

Mobilními fázemi pro RP-HPLC jsou acetonitril, *iso*-propanol, ethanol, methanol, voda a pufr. Používají se jednotlivě, ale i ve směsi. Pro dělení bazických nebo slabě kyselých látek je důležité pH, kdy ionizované formy látek budou eluovány rychleji.

### ***Čerpadlo<sup>39, 54</sup>***

Čerpadla musí být vysokotlaká, průtok musí být konstantní, reprodukovatelný, bezpulsní a jeho hodnoty by se měly pohybovat v  $\text{nl}\cdot\text{min}^{-1}$  pro kapilární kolony, v  $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$  pro mikronáplňové kolony, kolem  $1\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  pro běžné náplňové kolony a v desítkách  $\text{ml}\cdot\text{min}$  pro preparativní kolony. Pro malé průtoky se používají pístová čerpadla, což jsou v podstatě injekční stříkačky. Ty mají výhodu bezpulsního chodu. Pro běžné analytické kolony se používají dvoučinná čerpadla s nevýhodou pulsního chodu kompenzovaného však použitím více čerpadel současně.

### ***Dávkovací zařízení***

Za čerpadlem následuje dávkovací zařízení tvořené téměř výhradně dávkovacími ventily se smyčkou. Nejčastěji se setkáváme s šesticestnými ventily s vyměnitelnou smyčkou, která se plní injekční stříkačkou. Smyčka má objem od desítek nanolitů po mililitry. Dávkování je reprodukovatelné a lze snadno automatizovat. U kapilárních kolon, které vyžadují malé nástřiky v nanolitrech, se používají dávkovače s regulovanou dobou vyplachování smyčky do kolony nebo dávkovače s děličem.<sup>39</sup> Dalším typem dávkovacího zařízení je mikrostríkačka, kdy se vzorek dávkuje na náplň kolony speciálním vstupem. Nevzniká sice žádný mrtvý objem, tj. místo mimo kolonu, kde může docházet k ulpívání vzorku, ale je zde nebezpečí nadávkování nepřesného objemu. Dalším typem je automatický dávkovač, tedy počítačem kontrolované dávkovací zařízení.<sup>54</sup>

### ***Kolona***

Kolony bývají vyrobeny nejčastěji z nerezové oceli, v úvahu přichází i plast a sklo, protože materiály používané v HPLC musí být mechanicky i chemicky odolné a nesmí být povrchově aktivní. Vnitřní průměr se pohybuje řádově od desítek mikrometrů do 1 cm pro analytické kolony, po několik cm pro preparativní kolony, délka kolony je 5–30 cm.<sup>39</sup> Účinnost separace, doba analýzy a pracovní tlak se zvyšují s rostoucí délkou kolony a naopak klesají s rostoucím průměrem částic náplně. Při použití kolon s průměrem menším než 2 mm se hovoří o mikrokolonové kapalinové chromatografii a její předností je snížení spotřeby mobilní fáze i vzorku a zvýšení citlivosti detekce. V souvislosti s kolonou se často vyskytují již výše zmíněné pojmy normální a reverzní fáze, kdy u normálních fází bývá mobilní fází nepolární rozpouštědlo (pentan, hexan) a naopak u reverzních fází bývá mobilní fází polární rozpouštědlo (systém voda/acetonitril nebo voda/methanol) a stacionární fází bývá tedy nepolární oktasilan nebo oktadecylsilan. Asi 80 % aplikací HPLC využívá právě systému s obrácenými fázemi.

Předkolona je malé množství náplně, umístěné mezi dávkovačem a kolonou, která slouží k zachycení látek, které by kolonu mohly rušit.<sup>55</sup>

### ***Detektor***

Z kolony je eluát veden do detektoru, který slouží k identifikaci přítomného vzorku. Sleduje vlastnosti eluátu a převádí jejich změny na elektrické signály, které je po zesílení možno zaznamenat.<sup>56</sup>

Detektor by měl mít malý vnitřní objem, aby co nejméně přispíval k rozmytí elučnicích křivek. Jeho signál by měl být stabilní a reprodukovatelný, lineárně závislý na koncentraci v co nejširším rozsahu. Citlivost detektoru, tedy směrnice závislosti odezvy na koncentraci, by měla být co největší, mez detekce co nejnižší.

Detektory dělíme na univerzální (měří vlastnost systému jako celku) a selektivní (měří absorpenci při určité vlnové délce atd). Selektivní detektor je obvykle citlivější a vhodnější.<sup>39</sup>

**Detektor diodového pole (DAD)** patří mezi nejdokonalejší detektory, které umožňují získat spektrální data látek v průběhu celé analýzy. Průtokovou celou prochází polychromatické světlo, transmitované záření je spektrálně rozkládáno holografickou mřížkou, takže na každou z miniaturních fotodiod umístěných na destičce o délce cca 1 cm dopadá zářivý tok o určité vlnové délce zeslabený absorpcí v průtokové cele detektoru. Použití DAD je podmíněno softwarovým zázemím, které umožňuje např. průběžné hodnocení tzv. "čistoty píků", identifikaci neznámých složek pomocí spektrální knihovny, rychlé stanovení absorpčního maxima látky, kvantifikaci píků s odlišnými spektrálními vlastnostmi v jedné analýze apod.<sup>57</sup>

### ***Vyhodnocovací zařízení<sup>54</sup>***

Signál detektoru se vyhodnocuje počítačem. Záznamové zařízení převede signál na změnu napětí (mV), zapisovač ji dále vynese do grafu oproti retenčnímu času. Integrátor spočítá plochu pod křivkou grafu, která odpovídá množství látky v objemu vzorku. Následuje převedení na koncentrační jednotky.

### **2.6.6 Derivatizace<sup>39</sup>**

Derivatizací se rozumí převedení analytů na deriváty s cílem změnit jejich fyzikální a chemické vlastnosti. To znamená zlepšit detekovatelnost, stabilitu analytů, chromatografické vlastnosti, změnit matrice pro lepší separace atd. Nevýhodou je zavádění další operace, která zvyšuje komplexnost analýzy, chybu i dobu jejího trvání. Tyto nevýhody minimalizuje automatizace derivatizačního kroku. Reakce by měla být rychlá, kvantitativní, s minimem vedlejších produktů. Provádí se před kolonou nebo za ní. Hlavním důvodem derivatizace v HPLC je zvýšení citlivosti detektoru, kdy se do molekuly analytu zavádí chromofor pro UV detekci nebo fluorofor pro fluorescenční detekci.

### **2.6.7 HPLC flavonoidů**

Studium kvercetinu a rutinu v plazmě je důležité kvůli zjištění jejich vstřebatelnosti v lidském organismu.<sup>58</sup>

Metoda RP-HPLC je selektivní a jednoduchá metoda pro určování flavonoidů z různých zdrojů. Při separaci a kvantifikaci flavonoidů pomocí HPLC se používají kolony C8 (náplň kolony obsahuje oktanové skupiny) nebo C18 (oktadecylové skupiny). Tyto skupiny jsou navázány na povrchu stacionární fáze, jejímž základem je nejčastěji silikagel. Gradientová eluce je obvykle prováděna vodnou fází s přídatkem kyseliny octové, mravenčí, vedle nich methanolu nebo acetonitrilu, které představují organické modifikátory.<sup>13</sup> Poměry organické

a anorganické fáze v eluentu určují a ovlivňují retenční časy a tvary píků. Acetonitril a methanol přispívají ke snižování retenčních časů, vyšší obsah kyselin má pozitivní vliv na tvary píků, neboť vede k jejich zúžení snížením pH, dále snižuje dobu průchodu látky kolonou, což je žádoucí z hlediska zkrácení doby analýzy. Pro každý vzorek a každou látku je nutné optimalizovat správné podmínky HPLC, aby nedošlo ke sloučení dvou píků v jeden.<sup>58</sup>

HPLC se používá ve spojení s detektory jako je UV-VIS, DAD, PDA, MS. Všechny aglykony polyfenolů obsahují aspoň jedno aromatické jádro, proto dobře absorbují UV záření. Jejich detekce se provádí při vlnové délce 250, 265, 290, 350, 370 a 400 nm.<sup>13</sup> Touto metodou byly stanoveny flavonoidy v lidské plasmě (nap. kvercetin, naringenin a naringenin), v lidské moči (např. kvercetin a kaempferol).

Na speciální spektrální charakteristice flavonoidů je založena UV detekce s využitím PDA detektoru. Touto metodou byly stanoveny flavonoidy například v nápojích z pomeranče a grepu, v červeném ovoci jako jsou brusinky, maliny, jablka, v extraktech z čerstvého ovoce jako jsou borůvky, různé odrůdy jablek, grep atd.<sup>59</sup>

#### **2.6.7.1 Studie o HPLC stanovení flavonoidů bezu černého a jejich antioxidační aktivity**

Andrzej L. Dawidowicz a kolektiv se zabývali antioxidačními vlastnostmi alkoholových extraktů bezu černého. Jako materiál byly použity květy, listy a plody. 500 g vzorku bylo pomleto v mlýnku a zvážené porce byly použity pro PLE extrakci. 1 g materiálu byl smíchán se skleněnými kuličkami a vložen do 22 ml extrakční ocelové cely. Jako extrakční činidlo byla použita směs ethanolu a vody (80:20), extrakce trvala 10 minut při teplotě 20–200 °C. Extrakce byla 3 krát opakována, mezi opakováním byl systém proplachován extrakčním činidlem. Před HPLC analýzou s absorpčním detektorem (AD25) a s detektorem fotodiodového pole (PDA100 byly PLE extrakty podrobeny čištění přes SPE kolonky. Výtěžky SPE čištění byly lepší než 96 %. SPE byla provedena 3 krát pro každý PLE extrakt. Pro HPLC analýzu byla použita kolona Prodigy ODS-2 (5 μm, 250 x 4,5 mm), mobilní fáze kyseliny octové a vody obsahující 0,5 ml ledové kyseliny octové ve 100 ml (rozpouštědlo A) a acetonitril (rozpouštědlo B). Analýzy byly provedeny za izokratických elučních podmínek s užitím směsi rozpouštědel A a B (70:25 obj. %), extrakty z listů získány za teploty 20, 100 a 200 °C byly navíc analyzovány s HPLC gradientovými elučními podmínkami. Průtok mobilní fáze byl 1 ml.min<sup>-1</sup>, flavonoly byly detekovány při vlnové délce 350 nm a anthokyany při 520 nm. Dále byla určena antioxidační aktivita metodou DPPH odstraňující volné radikály a metodou s β-karotenem. U DPPH metody se měřil pokles absorbance při 515 nm v čase 0–120 min v časovém intervalu 15 min pro každý extrakt 3 krát. Stanovení aktivity s β-karotenem je založené na schopnosti extraktu snížit oxidační ztráty β-karotenu v emulzi β-karotenu a kyseliny linolové. 1,5 ml emulze bylo umístěno do zkumavky se 40 μl extraktu, zkumavka se dala do vodní lázně o teplotě 50 °C. Ihned se odečetlo 1. měření při 470 nm. Odečty probíhaly i u kontrolního vzorku (0,02 ml methanolu místo extraktu) v intervalu 15 min do odbarvení β-karotenu.

Antioxidační aktivita fenolových sloučenin může vycházet z terminace radikálových řetězových reakcí nebo z neutralizace volných radikálů, které iniciují oxidační procesy. U metody DPPH vyšla nejsilnější antioxidační aktivita u květových extraktů, nejslabší u extraktů z listů. U β-karotenu vyšly naopak listy nejlépe. Antioxidační schopnosti bezu černého jsou spojeny s přítomnými flavonoly a anthokyany, z nichž je zde nejvíce

prezentován rutin. Rutin, isokvercetin a astragalin jsou ve všech částech, ostatní pouze v plodech. Přímá korelace mezi množstvím flavonoidů a antioxidační aktivitou neexistuje. To dokazují výsledky metody za použití  $\beta$ -karotenu, protože u listů vyšel obsah flavonolu rutinu relativně nízký ( $16,73 \text{ g}/100\text{g}\cdot 10^{-2}$ ) v porovnání s květy ( $202,08 \text{ g}/100\text{g}\cdot 10^{-2}$ ), ale antioxidační aktivita vyšla při  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  největší.

Vliv teploty je nejlépe vidět u extraktů z listů, kdy listy tvoří největší část rostliny a představují lehce dostupný zdroj pro antioxidanty (při  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  téměř trojnásobně nižší výtěžnost než při  $100 \text{ }^\circ\text{C}$ ). U listových extraktů se s teplotou množství flavonolů mění však různě. U rutinu zpočátku zvýšení teploty vede ke zvýšení jeho množství, pak je konstantní. Nad  $160 \text{ }^\circ\text{C}$  množství rutinu v extraktu ubývá. Přesto studie ukazuje, že antioxidační schopnost u obou metod roste s teplotou až do  $200 \text{ }^\circ\text{C}$ . Tato neshoda se může vysvětlit parciální hydrolyzou glykosidových derivátů flavonolů, které se mohou za vyšších teplot objevovat. To vede ke vzniku aglykonových forem, které exhibují aktivitu antioxidantů. Jestli to tak ovšem je, měl by se objevit aglykon rutinu kvercetin, jehož přítomnost ale GC analýza nepotvrdila. Při  $160 \text{ }^\circ\text{C}$  klesá obsah rutinu, ale isokvercetin a astragalin rostou, a to může způsobit nárůst antioxidační aktivity.<sup>60</sup>

#### ***2.6.7.2 HPLC podmínky separace pro rutin, kvercetin a pro rutin a kvercetin ve směsi***

Příklady podmínek pro HPLC stanovení rutinu, kvercetinu nebo jejich směsi, které byly použity v několika studiích zabývajících se jejich separací z různých rostlinných matric, jsou uvedeny v Tab. 4. Pro separaci byly použity převážně kolony C18. Rozměry kolon a velikosti sorbentů se liší, průtok mobilní fáze ve většině případů byl  $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Čím kratší kolona, tím musí být nižší i rychlost průtoku eluentu, aby došlo k dostatečné separaci látek při průchodu kolonou.

Ve studiích byly nejvíce použity UV-VIS detektory a DAD detektory v rozmezí vlnových délek  $235\text{--}370 \text{ nm}$ . V rozmezí  $360\text{--}370 \text{ nm}$  má totiž rutin své absorpční maximum. Nástřík vzorku se pohyboval od  $15$  do  $50 \text{ }\mu\text{l}$ , nejčastěji byl v literatuře uveden nástřík  $20 \text{ }\mu\text{l}$ . Kolona byla ve většině případů udržována při laboratorní teplotě ( $20\text{--}25 \text{ }^\circ\text{C}$ ), maximální použitá teplota byla  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Ve většině studií byla použita gradientová eluce, která je náročnější, protože se musí připravit alespoň dvě mobilní fáze, ale dochází při ní k lepší separaci složek vzorku než při izokratické eluci, která byla také v několika studiích použita. Retenční časy se velice lišily v rozmezí  $2\text{--}40 \text{ min}$ .

Jako organická část mobilní fáze se ve směsi vyskytoval methanol, pak ACN a pouze v jednom případě byly oba dva v kombinaci. Na okyselení se nejvíce použila kyselina octová, také kyselina mravenčí. U rutinu se na okyselení mobilní fáze, která měla odlišné složení, používala převážně kyselina octová, ale i kyselina fosforečná. U stanovení kvercetinu se na okyselení mobilní fáze používala kyselina fosforečná a kyselina mravenčí.<sup>8, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77</sup>

Tab. 4 HPLC podmínky separace pro rutin, kvercetin a pro rutin a kvercetin ve směsi<sup>8</sup>, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77

Č.	Země, rok	Kolona	Rozměry kolony (mm) a částic (µm)	Mobilní fáze	Detekce, vlnová délka (nm)	Průtok (ml/min)	Nástřik (µl)	Teplota kolony (°C)	Retenční čas (min)	Gradient
1.61	Čína, 2007	Merck LiChrospher 100RP-18e	250x4,5	ACN:MeOH:THF ve vodě(19:5:1)(A) ACN:MeOH ve vodě pH 3(55:15)(B)	UV, 360	1	50	20	R: 9,833 K: 19,85	0-15 min (2 % B) 15-28 min (2-28%B) 28-40 min (28-36%B) 40-44 min (36%B) 44-45 min (36-38%B) 45-52 min (80%B)
2.62	Polsko, 2007	Luna C18	250x4,1, N	25mM fosfátový pufr pH 2,5 a MeOH (22:78)	DAD (L-7250), N	1	10	N	K:~15	Do 33 min 100% MeOH
3.63	Čína, 2010	Agilent Zorbax SB-C18	250x4,6, 5	MeOH (A) 0,1% mravenčí kyselina (B)	DAD(SPD-20AVP), 360	1	20	35	R: 18,6 K: 35,75	0-5 min (35-40% A) 5-40 min (40-50% A) 40-50 min (50-60% A) 50-55 min (60-65% A)
4.64	ČR, 2010	LiChrospher 100RP-18e	250x4,5	ACN (A), voda okyselená octovou kyselinou (pH 2,94)(B)	UV (LC1210UV), 335(rutin), 253(kvercetin)	1	20	N	R: 7,6 K: 15,1	0-35 min (85-25% B)
5.65	Čína, 2008	Sun Fire-C18	4,6x150, 5	MeOH (A), kyselina octová:voda (1:99) (B)	PAD (2996), 356,2 (rutin), 370,3 (kvercetin)	1	10	N	R: 12,30±0,07 K: 14,20±0,04	0-6,5 min (A:B 3:7), 6,5-14 min stoupání do (A:B 8:2), 14 min až konec (A:B 8:2)
6.8	Slovensko, 2009	Gemini C18	150x4,6, 3	1% kyselina mravenčí a v 2x destilované vodě (A), 100% ACN (B)	DAD, 350	1	20	25	N	Marks, Mullen and Crozier (2007)
7.66	Polsko, 2009	Merck RP-18e	100x4,6, N	50mM fosfátový pufr (pH 2,2):ACN (75:25)	DAD, 254	1	20	25	R: 1,88 K: 5,57	
8.67	Čína, 2009	Diamondsil C18	150x4,6, 5	MeOH:H2O (95:5)	UV, 254	0,5	10	30	R: ~2,75	

9. 68	Chorvatsko, 2008	LiChrospher 100-RP-18	125x4, 5	voda a kyselina mravenčí (95:5) (A), MeOH (B)	UV/VIS a PAD, 340	1	10	N	K: ±23	0-15 min (30% B) 15-20 min (30-40% B) 20-30 min (40-45% B) 30-50 min (45-60% B) 50-52 min (60-80% B) 52-60 min (80% B)
10. 69	Polsko, 2008	Ascentis C18	150x4,6, 5	2 mmol/l mravenčí kyselina (ph 2,7) (A) MeOH (B)	DAD (L-7450), 254	1	20	20-25	R: 26,29 K: 35,29	15 min (22% B) 17 min (40% B) 31 min (60% B) 38 min (22% B)
11. 70	USA, 2008	XTerra MS C18	250x4,6, 5	octová kyselina v MeOH (A), 0,3% octová kyselina ve vodě (B)	UV, rutin: 254,5 a 354,1 kvercetin: 254,5 a 367,0	1	20	25	R: 12,7 K: 17,2	0-10 min (35-50% A) 10-15 min (50-60% A) 15-18 min (60-65% A) 18-20 min (65-98% A) 20-30 min (100% A)
12. 71	Portugalsko, Chorvatsko, 2008	RP-Xbridge C18	150x4,6, 5	KCl a Voda/MeOH/mravenčí kyselina (83:16:1) (A), KCl a voda/MeOH/kyselina mravenčí (68,5:30:1,5) (B)	PAD 360 a ECD	1	50	40	ECD: R: 24,5±0,08 K: 40,7±0,04	0-11 min (100% A) 11-21 min (100-0% A) 21-65 min (100% B)
13. 72	Čína, 2007	Zorbax Extend C18	250x4,6, 5	0,4% vodná kyselina octová (A), ACN (B)	DAD, 360, DAD-MS	1	15	30	R: 33,6 K: 36,2	0-16 min (11% B) 16-28 min (11-16% B) 28-50 min (16% B) 50-65 min (16-30% B) 65-70 min (30-90% B) 70-75 min (90% B) 75-80 min (90-11% B) 80-85 min (11% B)
14a. 73	Itálie, 2000	Luna C18	150x2,0, 3	kyselina mravenčí (pH 2,4) (A): ACN (B) (80:20)	UV-VIS, 265	0,2	N	N	K: 4	0-2 min (50-65% B) 2-9 min (65% B) 9-11 min (65-50% B) 11-26 min (50% B)

14b.73	Itálie, 2000	C18 standardbore column	150x4,6, 5	ACN: fosfátový vodný pufr (pH 2,4 50:50)	5100A ESA Coulochem detector with a dual electrode analytical cell	0,8	N	N	K: 4,5
15.74	ČR, 2009	LiChrospher 100 CN	250x4, 5	ACN (A), voda (B)	LC 1210 UV, 235	1	20	N	R: 15 K: 35
16.75	Čína, 2005	RP-C18	250x4,6, 5	MeOH:ACN:kyselina o ctová:kyselina fosforečná:voda (2000:100:10:100:200)	DAD, 352	0,6	6	28	K: 18,3
17.76	Japonsko, Slovinsko , 2006	RP-C18	250x4, 5	ACN:MeOH (1:2) (A), 0,75% vodná fosforečná kyselina	380	N	N	N	0-20 min (100-40% B) 20-30 min (100% B)
18.77	Německo, 2009	Eurospere C18 RS	250x4,6, N	octový pufr (pH 4,6):ACN (80:20)	DAD 540, 255	N	N	N	N

\*N – neuvedeno

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Pomůcky

Běžné laboratorní sklo

Třecí miska s tloučkem

Mlýnek na kávu (Danesco, Česká republika)

Nerezové ocelové patrony na extrakci vzorků 11 ml

Celulózové mikrofiltry 0,45 µm (Chromservis, ČR)

Injekční stříkačky, 2 ml a 3 ml (Chirana Injecta, SR)

SPE kolonky, Oasis HLB 3cc (60mg) Extraction Cartridge (Waters, Irsko)

#### 3.2 Přístroje

Analytické váhy (Helago, Japonsko)

Laboratorní váhy (Kern KB, Německo)

Chladnička s mrazničkou (Amica, Polsko)

HPLC chromatograf LC-10AD (Schimadzu, Japonsko)

- ✓ Pumpa GT-104 (Schimadzu, Japonsko)
- ✓ Odplyňovač FCV-10AL (Schimadzu, Japonsko)
- ✓ Termostat CTO-10A (Schimadzu, Japonsko)
- ✓ DAD detektor SPD-M10AVP (Schimadzu, Japonsko)
- ✓ Kolona SUPELCOSIL<sup>TM</sup> LC-8DB; 5 µm; 250 x 4,6 mm (Supelco, USA)

One PSE (Applied Separation, USA) s příslušenstvím pro PSE

PHWE (Vyvinuté na Ústavu analytické chemie, Akademie věd Brno, Česká republika)

Počítač Acer

Software pro HPLC CLASS-LC10

Ultrazvuková lázeň (Kraintek, Slovenská republika)

#### 3.3 Chemikálie

Kyselina mravenčí, 98% (Lach-ner s.r.o., Neratovice, Česká republika)

Methanol CHROMASOLV pro HPLC, min. 99,9% (SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Německo)

Methanol pro HPLC super Gradient, min. 99,9% (Lach-ner s.r.o., Neratovice, Česká republika)

Redestilovaná voda (FCH VUT Brno, Česká republika)

Standardy:

- ✓ Rutin hydrát, min. 95% (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)

#### 3.4 Materiál

Materiálem pro výzkum byly listy a větvičky různých odrůd bezu černého (viz příloha P 1). Byly dodány Výzkumným a šlechtitelským ústavem ovocnářským Holovousy s.r.o. (Holovousy, Česká republika).

Ústav byl založen 1. 3. 1951 a umístěn do historické budovy zámku v Holovousích (Obr. 13). Od roku 1952 se stal jedním z ústavů Ministerstva zemědělství ČSR, v roce 1956 přešel pod přímé vedení Československé akademie zemědělských věd a v roce 1977 byl přičleněn jako samostatná hospodářská organizace k VHJ Sempra Praha. Byly k němu připojeny šlechtitelské stanice Těchobuzice, Velké Losiny a Velehrad. K 1. 7. 1997 byla založena nová společnost s ručením omezením pod názvem Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o. Majoritním podílníkem (51 %) nové společnosti je Sempra Praha a.s. Zbývající podíl má 6 výzkumných pracovníků ústavu.<sup>78</sup>



*Obr. 13 Zámek v Holovousích<sup>78</sup>*

Výzkumný ústav dodal listy a větvičky následujících odrůd (Tab. 5).

Tab. 5 Odrůdy bezu černého

Materiál	Listy a větvičky
Odrůda	Albida
	Allesö
	Aurea
	Bohatka
	Dana
	Gerda
	Heidegg 13
	Haschberg
	Körsör
	Madona
	Mammut
	Pregarten
	Riese aus Voßloch
	Sambo
	Sambu
	Samdal
	Sampo
Samyl	
Weihenstephan	

Větvičky a listy jednotlivých odrůd byly nastříhány v září 2010 a uskladněny na FCH v Brně při laboratorní teplotě.

Pro srovnávací měření byla obstarána Rouda nat' (*Herba Rutae*), Valdemar Grešík, NATURA s.r.o., Děčín, ČR a Pohanka (*Fagopyrum aesculentum*), A. J. Pleskač, ROSA CANINA, Veverská Bítýška.

### 3.5 Úprava rostlinných matric

Listy a větvičky celkem 19 odrůd bezu černého (Obr. 14) musely být před extrakcí rozdrobeny, aby vznikla co nejvíce homogenní směs. Listy byly podrceny v misce tloučkem, větvičky bylo potřeba rozdrtit mlýnkem na kávu. Vzorky před úpravou jsou uvedeny v příloze 2.



Obr. 14 Úprava rostlinných matric

## 3.6 Extrakční techniky

### 3.6.1 PHWE extrakce

Pro získání rutinu z rostlinných matric byla použita metoda extrakce rozpouštědlem za zvýšeného tlaku a teploty PHWE, extrakce horkou vodou. Postup extrakce zahrnoval 3 extrakční cykly po 5 minutách a tlak 150 barů. Po získání každého extraktu byl přístroj promýván minutu extrakčním rozpouštědlem, aby se předešlo ucpání systému. Dále byly extrakční podmínky nastaveny podle matrice, ze které extrakce probíhala, u extrakce rutinu z listů i větví byla použita teplota 80 °C. Tato metoda PHWE byla vyvinuta na Ústavu analytické chemie v Brně, kde také extrakce probíhaly.

Podrcené listy a větvičky byly dále na analytických váhách naváženy na hmotnost 2 g s přesností na 2 desetinná místa. U některých vzorků muselo být z důvodu nedostatku vzorku naváženo menší množství, např. odrůda Albida u větviček. Vzorek byl vložen do nerezových patron, které byly utěsněny fritkou a na jejich dno byl nasypán inertní materiál v podobě skleněných kuliček o velikosti 500–700  $\mu\text{m}$ . Obsah patrony byl doplněn inertními kuličkami a patrona byla vložena do extraktoru (Obr. 15). Plnění patrony je znázorněno v příloze 4.

Získaný extrakt bylo nutné co nejdříve zpracovat, aby se zabránilo úbytku rutinu. Proto byl extrakt týž den, maximálně den následující, kvantitativně převeden do 50 ml odměrné baňky a doplněn extrakčním rozpouštědlem (HPLC vodou) po rysku (viz příloha 5).

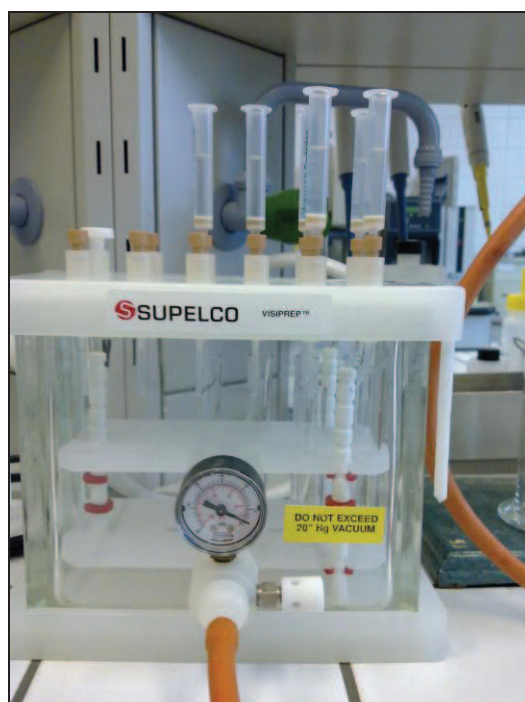


Obr. 15 PHWE zařízení

### 3.6.2 SPE extrakce

Před analýzou vzorku v HPLC byl PHWE extrakt dále přečištěn přes SPE kolonku. Žádoucí analyt byl získán elučním rozpouštědlem v podobě vysoce čistého extraktu.

Kolonka (Obr. 16) byla aktivována 2 ml methanolu, následně 2 ml HPLC vody. Dále bylo na kolonku nadávkováno 0,5 ml PHWE extraktu. Zkoumané látky zachycené na sorbentu byly eluovány 2 ml methanolu.



Obr. 16 SPE extrakce

### 3.7 HPLC analýza

K separaci vzorků byla použita kolona SUPELCOSIL<sup>TM</sup> LC-8DB o rozměrech 250 x 4,6 mm a velikosti částic sorbetu 5  $\mu\text{m}$ . Na základě literatury<sup>40</sup> byla jako mobilní fáze použita směs MeOH:H<sub>2</sub>O:HCOOH v poměru 36:61,5:2,5. Průtok eluentu kolonou byl nastaven na 1 ml.min<sup>-1</sup> a teplota na koloně byla 30 °C. Velikost dávkovací smyčky pro vzorek byla 10  $\mu\text{l}$ . Detekce látek byla provedena pomocí detektoru diodového pole při vlnové délce 360 nm.

PHWE extrakt přečištěný přes SPE kolonku byl získán v množství 2 ml. Poté byl naředěn oproti původnímu vzorku methanolem v poměru 1:4 (0,5 ml vzorku a 2 ml methanolu), aby nebyl překročen lineární rozsah spektrofotometrického měření. Následně byl naředěn ještě jednou vodou, a to vodou v poměru 2:3 (MeOH:H<sub>2</sub>O) kvůli zlepšení tvaru píků<sup>40</sup> (viz příloha 6). Na závěr byl přefiltrován přes mikrofilm (viz příloha 7). Takto získaný vzorek byl nadávkován do HPLC smyčky. Použitý HPLC chromatograf LC-10AD je uveden na Obr. 17.



Obr. 17 HPLC zařízení

### 3.8 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce a stanovitelnosti patří mezi validační parametry a vymezují použitelnost analytické metody. Udávají se v mg.l<sup>-1</sup>.

Mez detekce (Limit of detection LOD) je dána nejmenším množstvím analytu ve vzorku, které může být detekováno, ale nemusí být stanovitelné jako exaktní hodnota.<sup>46</sup> Určuje se jako trojnásobek maximálního kolísání základní linie slepého pokusu a odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. Odezva signálu se sleduje po dobu, která se určí jako dvacetinásobek pološířky píku.<sup>79</sup>

Mez stanovitelnosti (Limit of quantification LOQ) je nejnížší množství analytu ve vzorku, které může být stanoveno jako exaktní hodnota s požadovanou hodnotou nejistoty. Určuje se jako desetinásobek šumu základní linie a představuje množství analytu, které lze s definovanou přesností ještě stanovit.<sup>46, 79</sup>

### 3.9 Kalibrační křivka rutinu

Pro přípravu kalibrační křivky byly na analytických vahách naváženy 0,0400 g rutinu s přesností na 4 desetinná místa. Rutin byl kvantitativně převeden do 100 ml odměrné baňky a doplněn methanolem po rysku. Výsledná koncentrace takto připraveného standardního roztoku byla  $0,4 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

Ze standardního roztoku rutinu byla připravena kalibrační řada o koncentraci  $0,0032 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $0,0016 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $0,0032 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $0,008 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $0,016 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  a  $0,112 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Každá koncentrace byla 3 krát proměřena a z průměrných hodnot velikosti ploch píků byl sestrojen graf závislosti plochy píku na koncentraci rutinu. Koncentrace rutinu v reálných vzorcích byla vypočítána z rovnice regrese.

#### 3.9.1 Přepočítání koncentrace rutinu na gram reálného vzorku

2 ml vzorku odebrané z 25 ml odměrné baňky doplněné methanolem po rysku byly zředěny 3 ml vody. Z toho vyplývá, že z regresní rovnice byla získána koncentrace rutinu v 5 ml vzorku rutinu. Na základě vztahu (1) bylo vypočítáno množství rutinu v 5 ml vzorku.

$$m_{0,5\text{ml}} [\text{mg}] = c [\text{mg} / \text{ml}] \cdot V [\text{ml}] \quad (1)$$

c...koncentrace z regresní rovnice                      V...5 ml

Tato hmotnost rutinu byla získána z 0,5 ml SPE extraktu, reálného vzorku bylo však původně 50 ml (PHWE extrakt byl převeden do 50 ml odměrné baňky a doplněn extrakčním rozpouštědlem), proto tato hmotnost musela být vynásobena 100 podle vztahu (2).

$$m_{50\text{ml}} [\text{mg}] = m_{0,5\text{ml}} \cdot 100 \quad (2)$$

Jelikož 50 ml vzorku bylo získáno z 2 g rostlinné matrice, musela být hodnota podělena 2 podle vztahu (3).

$$c [\text{mg} / \text{g}] = \frac{m_{50\text{ml}} [\text{mg}]}{m_{\text{vzorku}} [\text{g}]} \quad (3)$$

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Experimentální část diplomové práce je věnována identifikaci a kvantifikaci rutinu ve větvičkách a listech různých odrůd bezu černého metodou HLPC s DAD detektorem. Odrůdy byly extrahovány technikou PHWE a přečištěny na SPE kolonkách. Rutin byl stanovován v 19 odrůdách bezu černého dodaných Výzkumným a šlechtitelským ústavem ovocnářským Holovousy.

### 4.1 Optimalizace separačního systému HPLC

Podle literatury<sup>40</sup>, z níž se při chromatografické separaci této diplomové práce vychází, byl původně průtok mobilní fáze  $0,7 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Za této podmínky byla však analýza zbytečně dlouhá. Proto bylo pro zkrácení doby analýzy experimentováno s rychlostí průtoku mobilní fáze.

Z testovaných průtoků mobilní fáze byl nejvýhodnější průtok mobilní fáze  $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Za těchto podmínek došlo k separaci vzorku a identifikaci píků. Doba analýzy se zkrátila téměř o 5 minut, kdy se retenční časy pohybovaly v rozmezí 5,9–6,5 min u rutinu a v rozmezí 13–14 min u kvercetinu. Proto byla mobilní fáze MeOH:H<sub>2</sub>O:HCOOH v poměru 36:61,5:2,5 s průtokem  $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  používána jako optimální pro separaci rutinu z reálných vzorků listů a větviček bezu černého.

### 4.2 Extrakční techniky

#### 4.2.1 PHWE

Pro extrakci byly vybrány podmínky na základě literatury<sup>80</sup>, zde se pro získání flavonoidů používaly 3 extrakční cykly po 5 minutách. Jako extrakční rozpouštědlo byla však použita voda, která byla zvolena na základě literatury<sup>40</sup> jako účinnější pro extrakci rutinu. Tlak byl nastaven na 150 barů. Extrakce všech odrůd probíhaly při teplotě 80 °C.

Jednotlivé extrakce byly provedeny v 11 ml nerezových ocelových patronách. Z každého cyklu bylo získáno cca 11 ml extraktu, celkové množství se tedy po třech cyklech pohybovalo kolem 33 ml, které byly doplněny na objem 50 ml extrakčním rozpouštědlem. Zisk extraktu je znázorněn na obrázku 18.

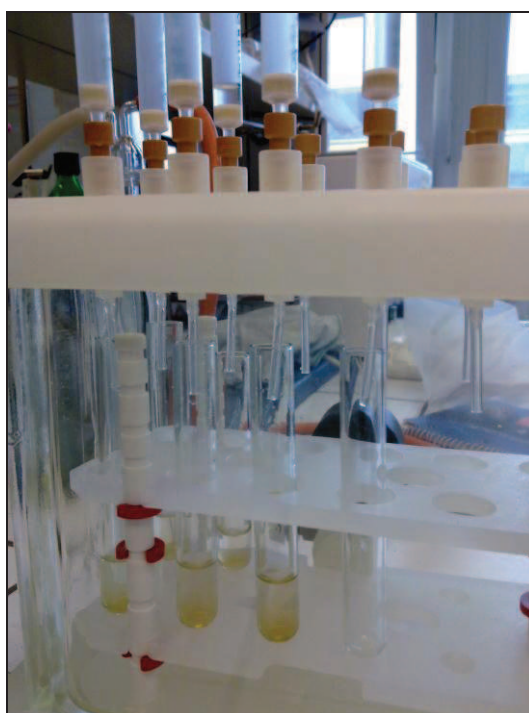


*Obr. 18 Probíhající PHWE extrakce*

#### **4.2.2 SPE**

Z PHWE extraktu doplněného na objem 50 ml bylo u každého vzorku odebráno 0,5 ml a podrobeno SPE extrakci popsané v kapitole 3.6.2.

Po aktivaci kolonek methanolem a vodou, které se nechaly odtéct do kádinky jako odpad, bylo dávkováno 0,5 ml vzorku. Následovala eluce zachyceného rutinu, kdy byly ze sorbentu získány methanolem do čistých zkumavek 2 ml vzorku. Tyto 2 ml byly naředěny vodou v poměru 2:3 a podrobeny HPLC analýze popsané v kapitole 3.7. Zisk 2 ml vzorku je znázorněn na Obr. 19.



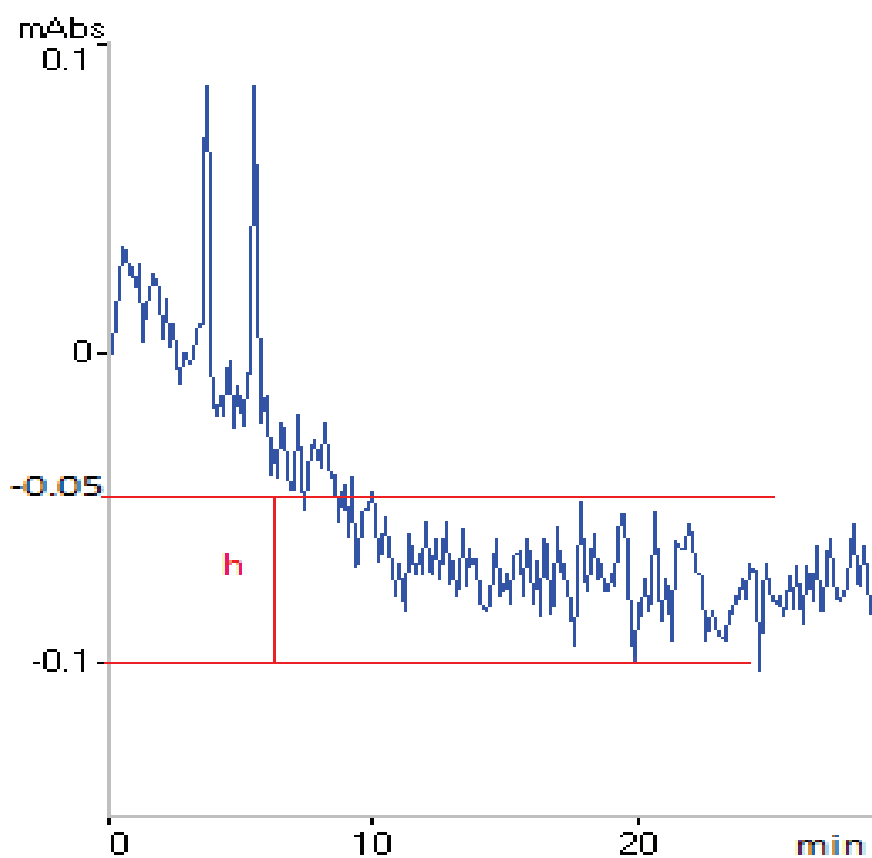
*Obr. 19 Zisk SPE extraktu pro HPLC analýzu*

### 4.3 Mez detekce a mez stanovitelnosti

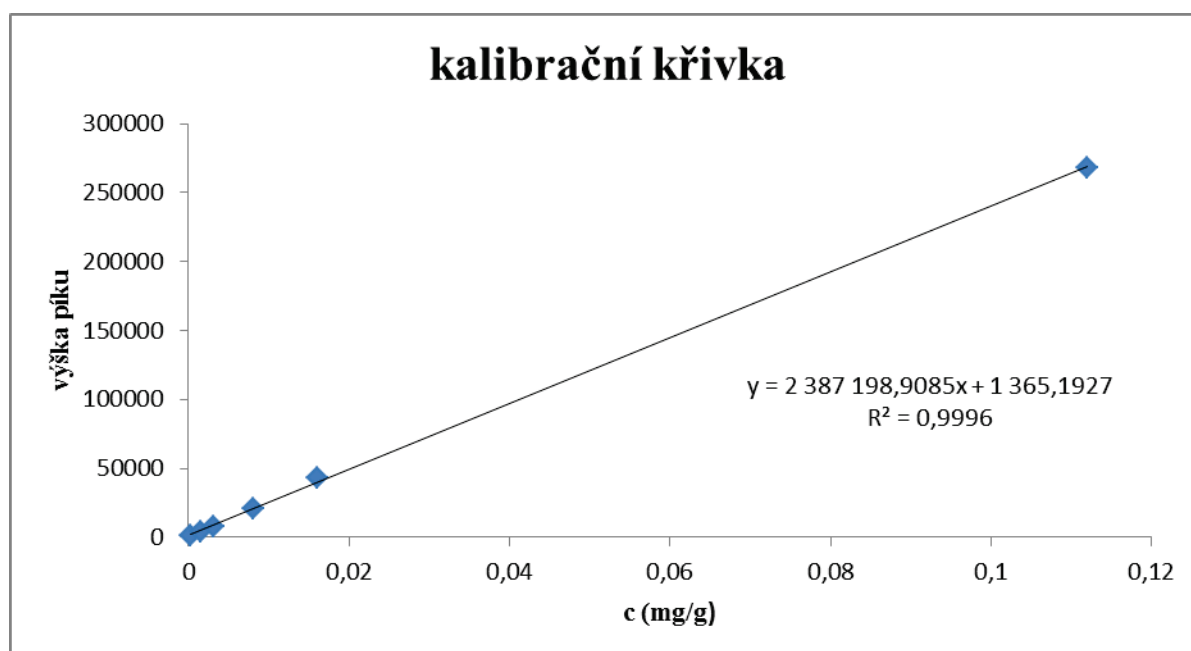
Pološířka píku rutinu byla určena na 0,3 minut, protože odezva signálu se sleduje po dobu odpovídající dvacetinásobku pološířky píku, byla sledována 6 minut. Maximální kolísání základní linie (hodnota  $h$  viz Obr. 20) slepého vzorku bylo odečteno jako 0,05 mAbs (tj. 50 strojových jednotek).

U meze detekce se hodnota kolísání základní linie pro získání koncentrace vynásobí 3 a vydělí směrnici ( $b$ ) kalibrační křivky (Graf 1) sestrojené jako závislost výšky píku na koncentraci látky v 5 ml vzorku ředěného vodou 2:3 (MeOH:H<sub>2</sub>O), nikoli jako závislost plochy píku na koncentraci.

U meze stanovitelnosti se hodnota kolísání linie vynásobí 10 a vydělí opět směrnici ( $b$ ) kalibrační křivky. Pro rutin byla mez detekce stanovena na  $6,3 \cdot 10^{-5} \text{ mg.ml}^{-1}$  a mez stanovitelnosti na  $2,1 \cdot 10^{-4} \text{ mg.ml}^{-1}$ .



Obr. 20 Odezva signálu slepého pokusu sledovaná 6 minut



Graf 1 Kalibrační závislost rutinu

Na základě porovnání meze detekce a meze stanovitelnosti s literaturou<sup>40</sup>, ve které bylo provedeno měření na tomtéž přístroji a byly nalezeny obdobné hodnoty, byla prokázána spolehlivost přístroje, a tím objektivnost získaných výsledků.

#### 4.4 Kalibrační křivka rutinu

Kalibrační křivka byla sestrojena na základě analýz několika hodnot koncentrací standardního roztoku rutinu viz kapitola 3.9. Kalibrační řada byla připravena následujícím způsobem podle Tab. 6 a Tab. 7. První a druhý bod kalibrační křivky odpovídající koncentracím  $0,0032 \text{ mg.ml}^{-1}$  a  $0,0016 \text{ mg.ml}^{-1}$  byly připraveny podle Tab. 6. Protože se v obou případech jednalo o přípravu koncentrace s ředěním v jednom kroku větším než 100 krát, což představuje větší riziko zavádění chyby, bylo ředění provedeno ve třech krocích, u zbývajících koncentrací ve dvou krocích.

V případě nejnižší koncentrace se jednalo o ředění 500 krát, proto bylo použito více kroků ředění, a to 10 krát a následně 50 krát. V prvním kroku bylo odebráno 2,5 ml ze standardního roztoku rutinu o koncentraci  $0,4 \text{ mg.ml}^{-1}$  do 25 ml odměrné baňky, ta byla doplněna methanolem po rysku. Tak byla získána koncentrace  $0,04 \text{ mg.ml}^{-1}$ . Z takto připraveného roztoku bylo následně odebráno 0,5 ml do další 25 ml odměrné baňky a doplněno methanolem po rysku pro získání koncentrace  $0,0008 \text{ mg.ml}^{-1}$ .

Jelikož byl standardní roztok doplněn 100% methanolem a mobilní fáze se má velmi podobat roztoku vzorku, bylo nutné přidat anorganickou fázi pro zlepšování tvaru píků. Pro úpravu tvaru píků byl použit vzorek ředěný vodou v poměru 2:3. Proto byly dále 25 ml roztoku odebrány 2 ml vzorku a naředěny 3 ml vody. Z toho důvodu byly tímto způsobem naředěny všechny body kalibrační křivky.

U druhého kalibračního bodu se jednalo o ředění 100 krát, proto byl připraven opět ve třech krocích. V prvním kroku bylo ze standardního roztoku napipetováno do 25 ml odměrné baňky 2,5 ml a doplněno methanolem po rysku na výslednou koncentraci  $0,04 \text{ mg.ml}^{-1}$ . Ve druhém kroku bylo z této baňky odebráno 2,5 ml do další 25 ml odměrné

baňky a doplněno methanolem na výslednou koncentraci 0,004 mg.ml<sup>-1</sup>. Z takto připraveného roztoku byly ve třetím kroku odebrány 2 ml a naředěny 3 ml vody na výslednou koncentraci 0,0016 mg.ml<sup>-1</sup> odpovídající druhému kalibračnímu bodu.

Tab. 6 Příprava 1. a 2. kalibračního bodu a jejich výsledné koncentrace

Označení baňky	Pipetovaný objem do 1. 25 ml baňky (ml)	Pipetovaný objem do 2. 25 ml baňky (ml)	Koncentrace kalibračních bodů (mg.ml <sup>-1</sup> )
1	2,5	0,5	0,00032
2	2,5	2,5	0,0016

Ostatní čtyři kalibrační body (třetí až šestý) byly připraveny podle Tab. 7. napipetováním 0,5 ml, 1,25 ml, 2,5 ml a 17,5 ml do 25 ml odměrné baňky, která byla doplněna methanolem po rysku. Z každého takto připraveného roztoku byly odebrány 2 ml a naředěny 3 ml vody.

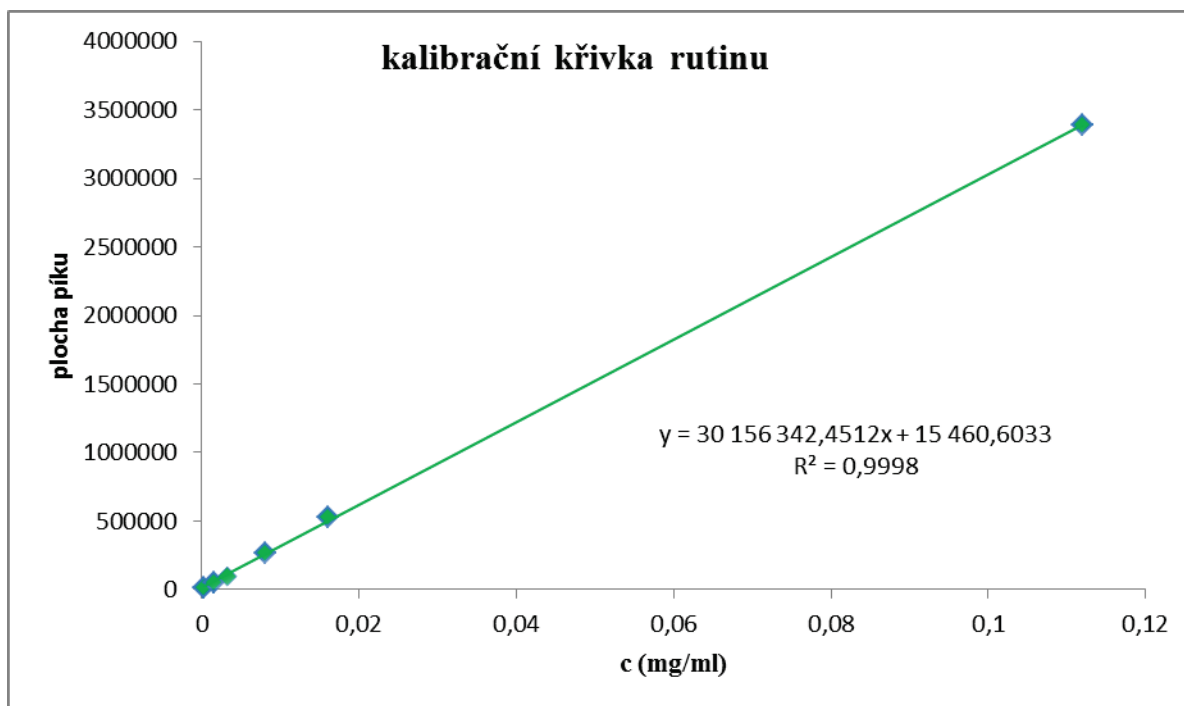
Tab. 7 Příprava 3. až 6. kalibračního bodu a jejich výsledné koncentrace

Označení baňky	Pipetovaný objem (ml)	Koncentrace kalibračních bodů (mg.ml <sup>-1</sup> )
3	0,5	0,0032
4	1,25	0,008
5	2,5	0,016
6	17,5	0,112

Každá koncentrace byla 3 krát proměřena a z průměrných hodnot velikosti ploch píků byl sestrojen graf závislosti plochy píku na koncentraci rutinu. Koncentrace rutinu v reálných vzorcích byla vypočítána z rovnice regrese. Koncentrace rutinu je uvedena v 5 ml vzorku ředěného vodou v poměru 2:3 (MeOH:H<sub>2</sub>O). Koncentrace rutinu v odrůdách byla vypočtena na základě rovnice regrese, která má tvar  $y = 30\,156\,342,4512x + 15\,460,6033$  a je uvedena v grafu 2.

Tab. 8 Průměrné hodnoty kalibračních bodů

Koncentrace (mg/ml)	Retenční čas (min)	Plocha píku	Výška píku
0,00032	6,6	10 936,3	874,7
0,00160	6,5	53 255,7	4 281,3
0,00320	6,4	97 224,0	7 491,0
0,0080	6,3	267 967,7	21 230,7
0,0160	6,2	530 982,3	42 620,0
0,1120	5,9	3 388 060,7	293 791,7



Graf 2 Kalibrační závislost rutinu

## 4.5 Obsah rutinu v bezu černém

### 4.5.1 Rutin v listech

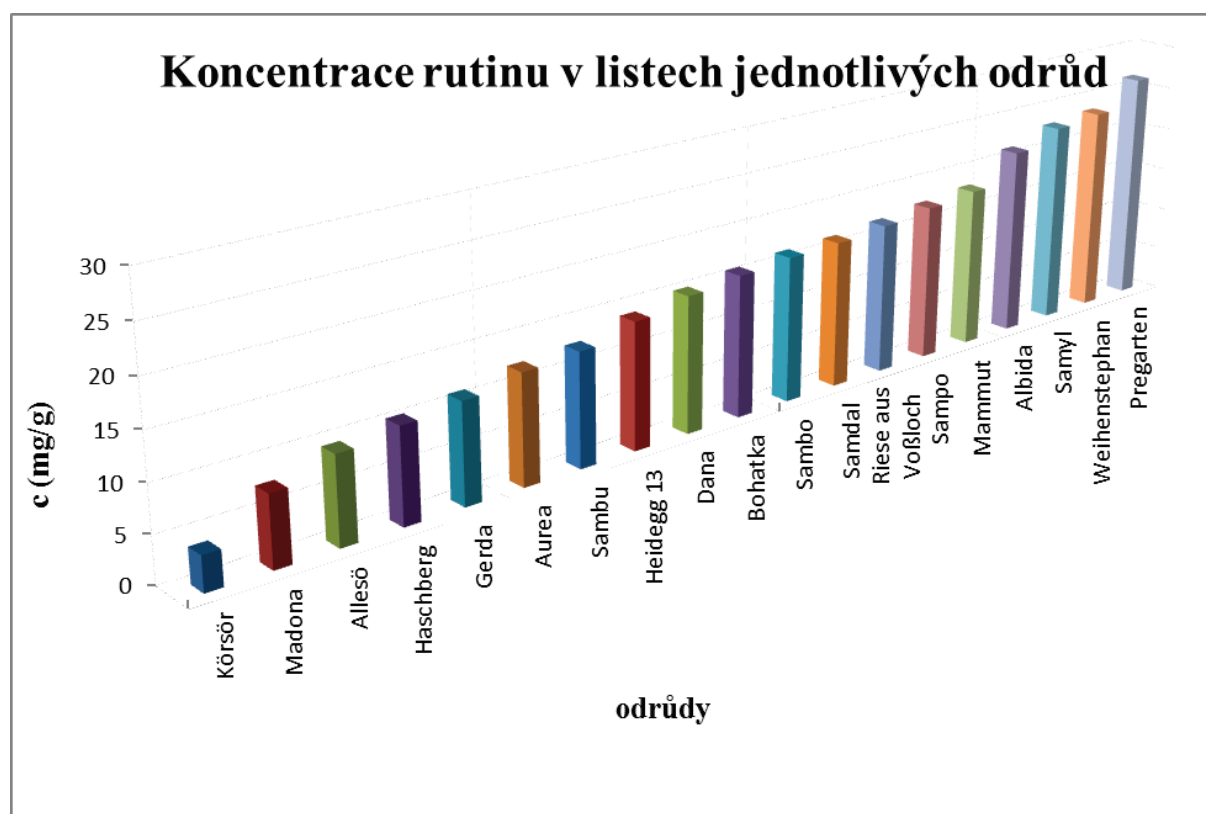
Jako zdroj listů pro stanovení obsahu rutinu posloužilo devatenáct šlechtěných odrůd bezu černého. Usušené a rozdrčené listy byly extrahovány metodou PHWE vodou při teplotě 80 °C viz kapitola 4.2.1. Po přečištění a zakoncentrování přes SPE kolonky byly listy analyzovány vysoce účinnou kapalinovou chromatografií a následně detekovány detektorem diodového pole při vlnové délce 360 nm.

Z regresní rovnice kalibrační křivky rutinu uvedené v kapitole 4.4 byly vypočítány výsledné koncentrace rutinu v devatenácti zkoumaných odrůdách. Takto zjištěné koncentrace rutinu byly přepočítány na gram vzorku na základě rovnic v kapitole 3.9.1.

Množství rutinu ve všech odrůdách extrahovaných vodou při teplotě 80 °C je uvedeno v Tab. 9 a Grafu 3. Pro větší přehlednost byla sestavena tabulka (Tab. 10) uvádějící pořadí odrůd podle jejich obsahu rutinu (i směrodatnou odchylkou), tedy tabulka rozděluje odrůdy z hlediska jejich významnosti v obsahu rutinu v listech.

Tab. 9 Koncentrace rutinu v listech

Koncentrace rutinu v listech bezu černého extrahovaného vodou při 80°C				
Odrůda	c z regr. rovnice (mg.ml <sup>-1</sup> )	m <sub>0,5 ml</sub> (mg)	m <sub>50 ml</sub> (mg)	c (mg.g <sup>-1</sup> )
Albida	84,8 · 10 <sup>-3</sup>	42,42 · 10 <sup>-2</sup>	42,42	21,21
Allesö	38,0 · 10 <sup>-3</sup>	18,98 · 10 <sup>-2</sup>	18,98	9,49
Aurea	48,5 · 10 <sup>-3</sup>	24,27 · 10 <sup>-2</sup>	24,27	12,13
Bohatka	63,0 · 10 <sup>-3</sup>	31,49 · 10 <sup>-2</sup>	31,49	15,74
Dana	60,4 · 10 <sup>-3</sup>	30,20 · 10 <sup>-2</sup>	30,20	15,10
Gerda	44,0 · 10 <sup>-3</sup>	22,00 · 10 <sup>-2</sup>	22,00	11,00
Heidegg 13	56,1 · 10 <sup>-3</sup>	28,04 · 10 <sup>-2</sup>	28,04	14,02
Haschberg	41,5 · 10 <sup>-3</sup>	20,74 · 10 <sup>-2</sup>	20,74	10,37
Körsör	11,8 · 10 <sup>-3</sup>	5,88 · 10 <sup>-2</sup>	5,88	3,74
Madona	30,5 · 10 <sup>-3</sup>	15,23 · 10 <sup>-2</sup>	15,23	7,61
Mammut	71,9 · 10 <sup>-3</sup>	35,97 · 10 <sup>-2</sup>	35,97	17,99
Pregarten	97,6 · 10 <sup>-3</sup>	48,79 · 10 <sup>-2</sup>	52,69	26,34
Riese aus Voßloch	67,2 · 10 <sup>-3</sup>	33,61 · 10 <sup>-2</sup>	33,61	16,81
Sambo	64,7 · 10 <sup>-3</sup>	32,37 · 10 <sup>-2</sup>	32,37	16,18
Sambu	50,2 · 10 <sup>-3</sup>	25,08 · 10 <sup>-2</sup>	25,08	12,54
Samdal	65,3 · 10 <sup>-3</sup>	32,66 · 10 <sup>-2</sup>	32,66	16,33
Sampo	69,7 · 10 <sup>-3</sup>	34,87 · 10 <sup>-2</sup>	34,87	17,44
Samyl	91,5 · 10 <sup>-3</sup>	45,73 · 10 <sup>-2</sup>	45,73	22,86
Weihenstephan	79,5 · 10 <sup>-3</sup>	39,73 · 10 <sup>-2</sup>	39,73	23,37



Graf 3 Koncentrace rutinu v listech jednotlivých odrůd bezu černého

Graf 3 stejně jako následující tabulka Tab. 10 shrnují významnost odrůd z hlediska obsahu rutinu v listech. Z grafu je patrné, že nejvíce rutinu bylo nalezeno v odrůdě Pregarten, a to  $26,34 \text{ mg.g}^{-1}$ , což je 7 krát více než bylo zjištěno u odrůdy Körsör, kde bylo pouze  $3,74 \text{ mg.g}^{-1}$  a jedná se tedy o odrůdu nechudší na rutin. I přesto se o této odrůdě dá hovořit jako o odrůdě bohaté na množství rutinu (viz další kapitola). Za zmínku stojí jistě i další odrůdy v níže uvedené tabulce, jako je Weihenstephan, Samyl, Albida, Mammut a další, které se mohou pyšnit také velmi významným množstvím rutinu.

Příloha 9 obsahuje chromatogram listů odrůdy Pregarten. Přílohy 10 a 11 obsahují chromatogram listů odrůd Allesö a Bohatka.

*Tab. 10 Významnost odrůd z hlediska obsahu rutinu v listech*

Odrůda	c ( $\text{mg.g}^{-1}$ )
Pregarten	$26,34 \pm 0,50$
Weihenstephan	$23,37 \pm 0,50$
Samyl	$22,86 \pm 0,72$
Albida	$21,21 \pm 0,41$
Mammut	$17,99 \pm 0,43$
Sampo	$17,44 \pm 0,14$
Riese aus Voßloch	$16,81 \pm 0,39$
Samdal	$16,33 \pm 0,64$
Sambo	$16,18 \pm 0,43$
Bohatka	$15,74 \pm 0,45$
Dana	$15,10 \pm 0,24$
Heidegg 13	$14,02 \pm 0,44$
Sambu	$12,54 \pm 0,25$
Aurea	$12,13 \pm 0,34$
Gerda	$11,00 \pm 0,34$
Haschberg	$10,37 \pm 0,06$
Allesö	$9,49 \pm 0,17$
Madona	$7,61 \pm 0,81$
Körsör	$3,74 \pm 0,13$

Množství rutinu v listech bezu černého by mohlo být ovlivněno vegetačním obdobím, ve kterém byly posbírány. Listy pro účely této práce byly posbírány na konci vegetačního období a vzhledem k nalezenému množství rutinu a následnému srovnání v dalších kapitolách se jeví toto období vhodným pro sběr. Otázkou je, jakých hodnot by bylo dosaženo při stanovení rutinu v listech posbíraných například na začátku vegetačního období nebo pár měsíců před vrcholem, což však nebylo náplní této práce.

S množstvím rutinu souvisí jistě i podnebí, kde rostlina roste a neodmyslitelně UV záření. Množství rutinu v rostlinách je velmi závislé na UV záření. Čím je více UV záření, tím více rutinu se nachází v daných rostlinných zdrojích.<sup>30, 81</sup> Tím se dostáváme k možnému řešení otázky vegetačního období, jelikož obsah rutinu souvisí s UV zářením, je nejvhodnějším obdobím pro sběr rostlin právě konec vegetačního období, nikoliv začátek.

Při hodnocení významnosti obsahu rutinu v listech je nutno brát v úvahu i stáří rostliny, které by mělo mít podle všeho výše zmíněného pozitivní vliv.

#### 4.5.2 Rutin ve větvičkách

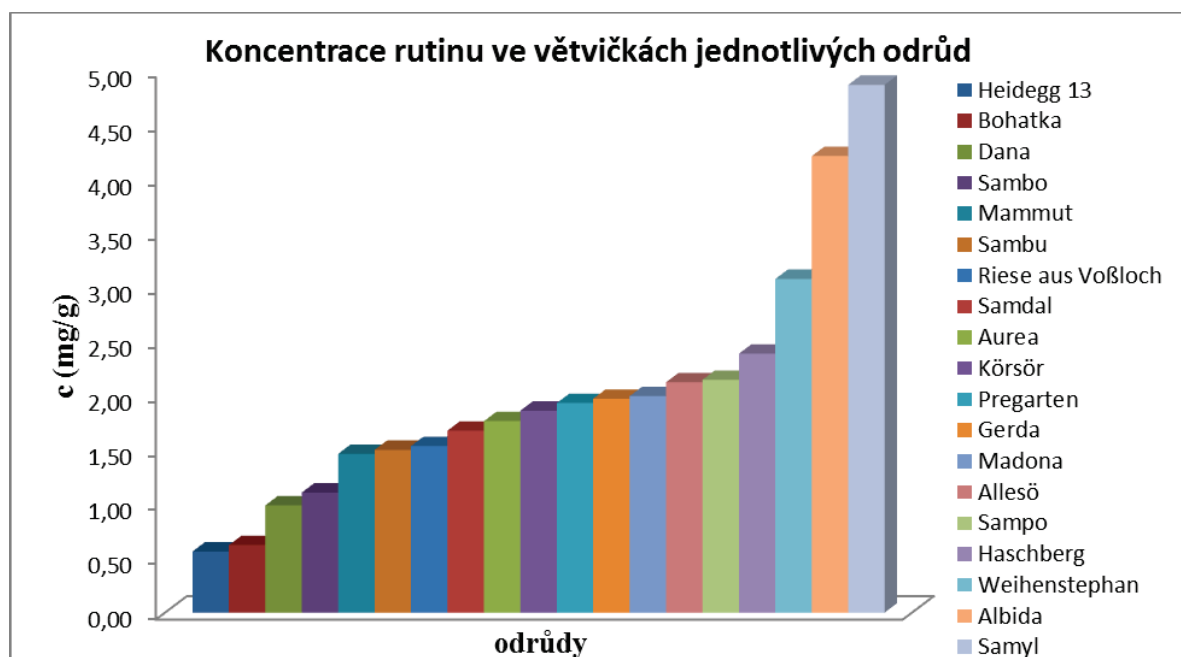
Ke stanovení obsahu rutinu ve větvičkách bylo opět použito devatenáct šlechtěných odrůd bezu černého dodaných Výzkumným a šlechtitelským ústavem ovocnářským Holovousy. Suché a rozdrcené větvičky byly extrahovány metodou PHWE vodou při teplotě 80 °C, Získané extrakty byly následně přečištěny a zakonzentrovány přes SPE kolonky a analyzovány vysoce účinnou kapalinovou chromatografií stejně jako listy bezu černého. Detekce probíhala stejným způsobem jako u listů.

Koncentrace rutinu ve větvičkách byly vypočítány pomocí regresní rovnice určené z kalibrační křivky rutinu a přepočítány na množství rutinu obsaženého v jednom gramu vzorku. Množství rutinu ve větvičkách všech analyzovaných odrůd je uvedeno v Tab. 11 a Grafu 4. Pro větší přehlednost byla sestavena tabulka (Tab. 12) uvádějící pořadí odrůd podle jejich obsahu rutinu, tedy tabulka rozdělující odrůdy z hlediska jejich významnosti v obsahu rutinu ve větvičkách.

Tab. 11 Koncentrace rutinu ve větvičkách

<b>Koncentrace rutinu ve větvičkách bezu černého extrahovaného vodou při 80°C</b>				
<b>Odrůda</b>	<b>c z regr. rovnice (mg.ml<sup>-1</sup>)</b>	<b>m<sub>0,5 ml</sub> (mg)</b>	<b>m<sub>50 ml</sub> (mg)</b>	<b>c (mg.g<sup>-1</sup>)</b>
Albida	10,4 · 10 <sup>-3</sup>	5,18 · 10 <sup>-2</sup>	5,18	4,21
Allesö	8,5 · 10 <sup>-3</sup>	4,25 · 10 <sup>-2</sup>	4,25	2,13
Aurea	7,1 · 10 <sup>-3</sup>	3,53 · 10 <sup>-2</sup>	3,53	1,77
Bohatka	2,5 · 10 <sup>-3</sup>	1,24 · 10 <sup>-2</sup>	1,24	0,62
Dana	4,0 · 10 <sup>-3</sup>	1,98 · 10 <sup>-2</sup>	1,98	0,99
Gerda	7,9 · 10 <sup>-3</sup>	3,95 · 10 <sup>-2</sup>	3,95	1,97
Heidegg 13	2,3 · 10 <sup>-3</sup>	1,13 · 10 <sup>-2</sup>	1,13	0,56
Haschberg	9,6 · 10 <sup>-3</sup>	4,78 · 10 <sup>-2</sup>	4,78	2,39
Körsör	7,5 · 10 <sup>-3</sup>	3,73 · 10 <sup>-2</sup>	3,73	1,86
Madona	8,0 · 10 <sup>-3</sup>	4,00 · 10 <sup>-2</sup>	3,40	2,00
Mammut	5,9 · 10 <sup>-3</sup>	2,93 · 10 <sup>-2</sup>	2,93	1,47
Pregarten	7,7 · 10 <sup>-3</sup>	3,87 · 10 <sup>-2</sup>	3,87	1,93
Riese aus Voßloch	6,1 · 10 <sup>-3</sup>	3,07 · 10 <sup>-2</sup>	3,07	1,54
Sambo	4,4 · 10 <sup>-3</sup>	2,22 · 10 <sup>-2</sup>	2,22	1,11
Sambu	6,0 · 10 <sup>-3</sup>	3,00 · 10 <sup>-2</sup>	3,00	1,50
Samdal	6,7 · 10 <sup>-3</sup>	3,36 · 10 <sup>-2</sup>	3,36	1,68
Sampo	8,6 · 10 <sup>-3</sup>	4,30 · 10 <sup>-2</sup>	4,30	2,15
Samyl	19,5 · 10 <sup>-3</sup>	9,73 · 10 <sup>-2</sup>	9,73	4,87
Weihenstephan	12,3 · 10 <sup>-3</sup>	6,16 · 10 <sup>-2</sup>	6,16	3,08

Graf 4 stejně jako následující tabulka Tab. 12 shrnují významnost odrůd z hlediska obsahu rutinu ve větvičkách. Z grafu je patrné, že nejvíce rutinu bylo nalezeno v odrůdě Samyl, a to  $4,87 \text{ mg.g}^{-1}$ . V porovnání s odrůdou Heidegg 13, kde bylo naměřeno pouhých  $0,65 \text{ mg.g}^{-1}$ , což je 7 krát méně než u odrůdy Samyl, se dá o odrůdě Samyl hovořit jako o odrůdě bohaté na rutin. To však nejde odepřít ani odrůdě Heidegg 13, protože se i s tak relativně nízkým množstvím rutinu řadí mezi jeho významné zdroje (viz dále). K dalším odrůdám s nejvyšším množstvím rutinu stanoveným ve větvičkách se řadí odrůdy Albida, Weihenstephan, Haschberg, Sampo, Allesö a další, u kterých bylo naměřeno také významné množství rutinu.



Graf 4 Koncentrace rutinu ve větvičkách jednotlivých odrůd bezu černého

Tab. 12 Významnost odrůd z hlediska obsahu rutinu ve větvičkách

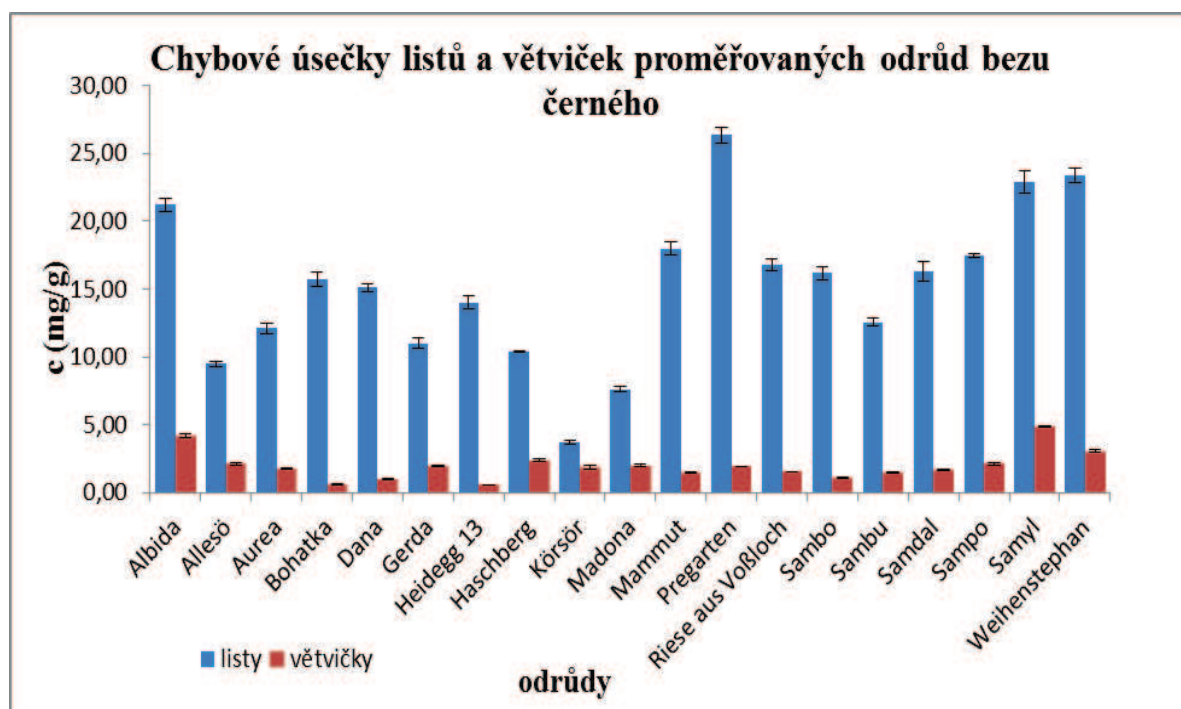
Odrůda	c (mg.g <sup>-1</sup> )
Samyl	$4,87 \pm 0,01$
Albida	$4,21 \pm 0,13$
Weihenstephan	$3,08 \pm 0,10$
Haschberg	$2,39 \pm 0,08$
Sampo	$2,15 \pm 0,08$
Allesö	$2,13 \pm 0,06$
Madona	$2,00 \pm 0,09$
Gerda	$1,97 \pm 0,05$
Pregarten	$1,93 \pm 0,02$
Körsör	$1,86 \pm 0,10$
Aurea	$1,77 \pm 0,06$
Samdal	$1,68 \pm 0,07$
Riese aus Voßloch	$1,54 \pm 0,02$
Sambu	$1,50 \pm 0,03$

Mammut	1,47 ± 0,03
Sambo	1,11 ± 0,04
Dana	0,99 ± 0,03
Bohatka	0,62 ± 0,02
Heidegg 13	0,56 ± 0,01

#### 4.5.3 Statistická data

Větvičky a listy každé odrůdy byly vždy třikrát analyzovány. Získaná data byla zpracována v programu MS Excel, kde byl spočítán průměrný obsah rutinu pomocí funkce PRŮMĚR, směrodatná odchylka pomocí funkce SMODCH.P a interval spolehlivosti pomocí funkce CONFIDENCE.NORM (viz příloha 8). Bylo počítáno s hodnotou hladiny statistické významnosti  $\alpha = 0,05$ .

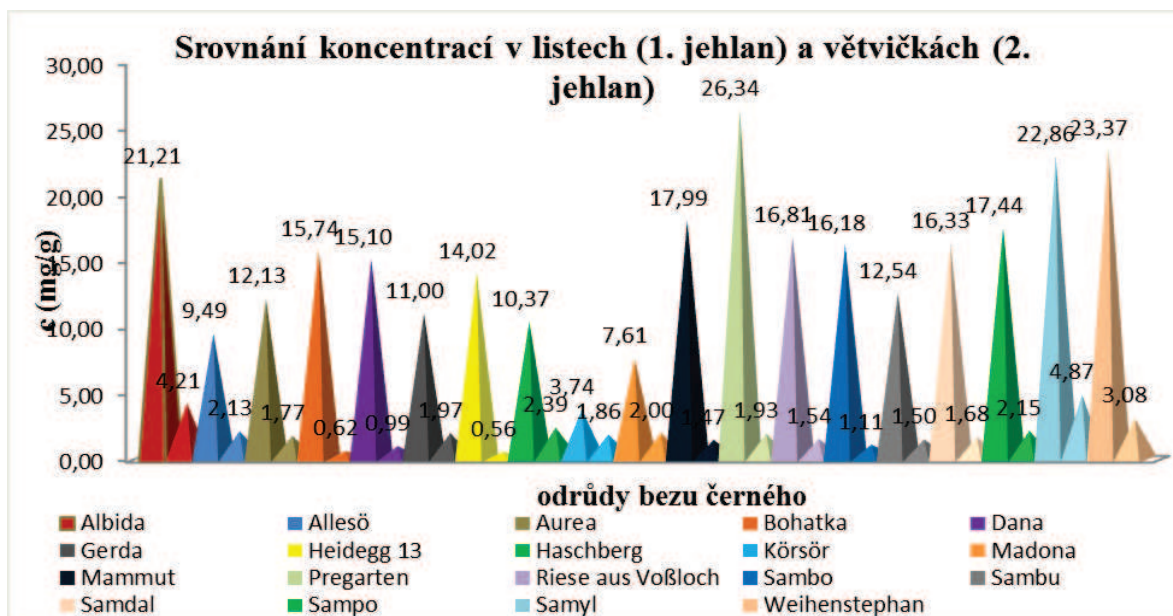
Do Grafu 5 byly zakresleny chybové úsečky.



Graf 5 Chybové úsečky listů a větviček bezu černého

#### 4.5.4 Srovnání obsahu rutinu ve větvičkách a v listech

Jak už bylo zmíněno v kapitole 4.5.1, množství rutinu v rostlinách je velmi závislé na UV záření. Čím je více UV záření, tím více rutinu se nachází v daných rostlinných zdrojích. Vzhledem k tomu, že listy bezu mají velkou plochu (a obsahují velké množství chlorofylu), dá se předpokládat, že více slunečních paprsků dopadne právě na listy. Větvičky jsou těmito listy obklopeny, a tak průnik slunečních paprsků k větvičkám je omezen. Tím by se dal vysvětlit významný rozdíl v množství rutinu mezi listy a větvičkami bezu černého. Je nutné zmínit, že stejně jako listy, tak větvičky se řadí k významným zdrojům rutinu i přes tyto rozdíly v množství rutinu. Graf 6 uvádí srovnání obsahu rutinu v listech a větvičkách u příslušných odrůd.



Graf 6 Srovnání obsahu rutinu v listech a větvičkách u příslušných odrůd

V grafu je každá odrůda odlišena jinou barvou shodnou pro listy i větvičky. Příslušné koncentrace jsou uvedeny nad jehlany.

U listů je na prvním místě s obsahem rutinu odrůda Pregarten  $26,34 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , a u větviček s množstvím rutinu  $1,93 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  je až na místě desátém. U listů se tedy vyskytuje u té samé odrůdy rutin v koncentraci 13,6 krát vyšší než u větviček. U větvi si prvenství obhájila odrůda Samyl (chromatogram viz příloha 15) s koncentrací rutinu  $4,87 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  a u listů obstála tato odrůda jako třetí s koncentrací  $22,86 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  (4,6 krát vyšší).

Tato nejvyšší koncentrace u větviček by se dala srovnat s koncentrací získanou u listů odrůdy Körsör  $3,74 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , která však byla zhodnocena jako odrůda na rutin nejchudší. Příloha 14 obsahuje srovnání chromatogramů odrůdy Körsör u větviček a listů.

Množství získaného rutinu závisí samozřejmě na matici, ze které je získáván. Listy a větvičky bezu černého musely být před extrakcí rozdrobeny, aby vznikla co nejvíce homogenní směs. Listy byly podrceny v misce tloučkem, větvičky bylo potřeba rozdrtit mlýnkem na kávu. Získání požadované velikosti vzorku bylo u větviček mnohem namáhavější, a to časově i fyzicky. To může mít také zásadní vliv na množství získaného rutinu. Listy bezu černého jsou bohatým zdrojem rutinu, avšak větvičky k němu také neodmyslitelně patří.

#### 4.5.5 Srovnání bezu černého s významnými zdroji rutinu

Pro srovnání významnosti větviček a listů bezu černého z hlediska obsahu rutinu byly analyzovány ještě další dva zdroje, a to pohanka a ruta (viz příloha 3).

K analýze byly použity 2 g obou sušených drog s přesností na dvě desetinná místa. PHWE extrakce vzorků byla prováděna způsobem popsáným v kapitole 3.6.1. Získané extrakty byly kvantitativně převedeny do 50 ml odměrných baněk a doplněny po rysku extrakčním rozpouštědlem. Další zpracování, SPE extrakce, je opět totožné se zpracováním bezu černého popsáné v kapitole 3.6.2.

K separaci extraktů pohanky a routy byla použita stejná kolona i chromatogram jako při analýze bezu černého. Rovněž mobilní fáze a všechny podmínky analýzy byly shodné jako u bezu černého.

Koncentrace rutinu v pohance a routě byla spočítána z rovnice regrese a vyjádřena v gramu vzorku podle vztahů uvedených v kapitole 3.9.1.

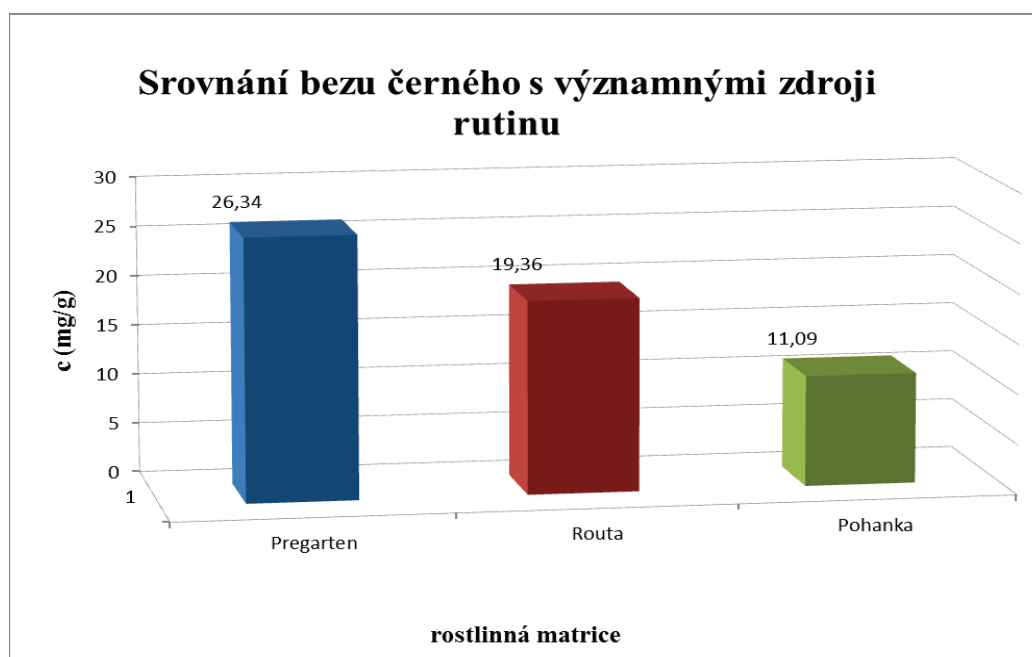
K nejvýznamnějším zdrojům rutinu se v současné době řadí pohanka, ruta, laskavec a jerlín japonský. Pro účely diplomové práce bylo provedeno stanovení rutinu v routě a pohance. Tab. 13 obsahuje průměrné retenční časy, plochy píků a koncentrace rutinu nalezené v pohance a routě pro ověření významnosti listů a větviček bezu černého jakožto zdroje rutinu.

Tab. 13 Významné zdroje rutinu

Zdroj rutinu	Retenční čas (min)	Plocha píku	Koncentrace ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )
Pohanka	5,9	1352869,7	$11,09 \pm 0,08$
Routa	5,8	2351301,0	$19,36 \pm 0,15$

Jak je patrné z tabulky, u pohanky a routy, které se řadí mezi významné zdroje rutinu, byly naměřené nižší koncentrace rutinu než u velké části analyzovaných listů odrůd bezu černého. Ve výčtu odrůd bezu černého analyzovaných na obsah rutinu v listech se pohanka řadí v množství rutinu na 15. místo mezi Aureu a Gerdu, ruta je na tom o něco lépe na místě 5. mezi Albidou a Mammutem. Příloha 12 uvádí chromatogram pohanky, příloha 13 chromatogram routy.

Graf 7 znázorňuje, jak si mezi těmito významnými zdroji stojí Pregarten, nejbohatší odrůda na rutin v listech. U odrůdy Pregarten bylo nalezeno 1,36 krát více rutinu než u routy a 2,38 krát více rutinu než u pohanky. Routa tedy v obsahu rutinu pokrývá 73,5 % obsahu rutinu u Pregartenu a pohanka dosahuje pouhých 42,1 % obsahu rutinu. I přesto jsou ruta a pohanka uznávány jako bohaté zdroje rutinu, tutíž listy bezu černého patří také neodmyslitelně k těmto významným zdrojům rutinu.



Graf 7 Srovnání nejbohatší odrůdy bezu černého s významnými zdroji rutinu

#### 4.5.6 Srovnání bezu černého s významnými zdroji rutinu na základě literatury

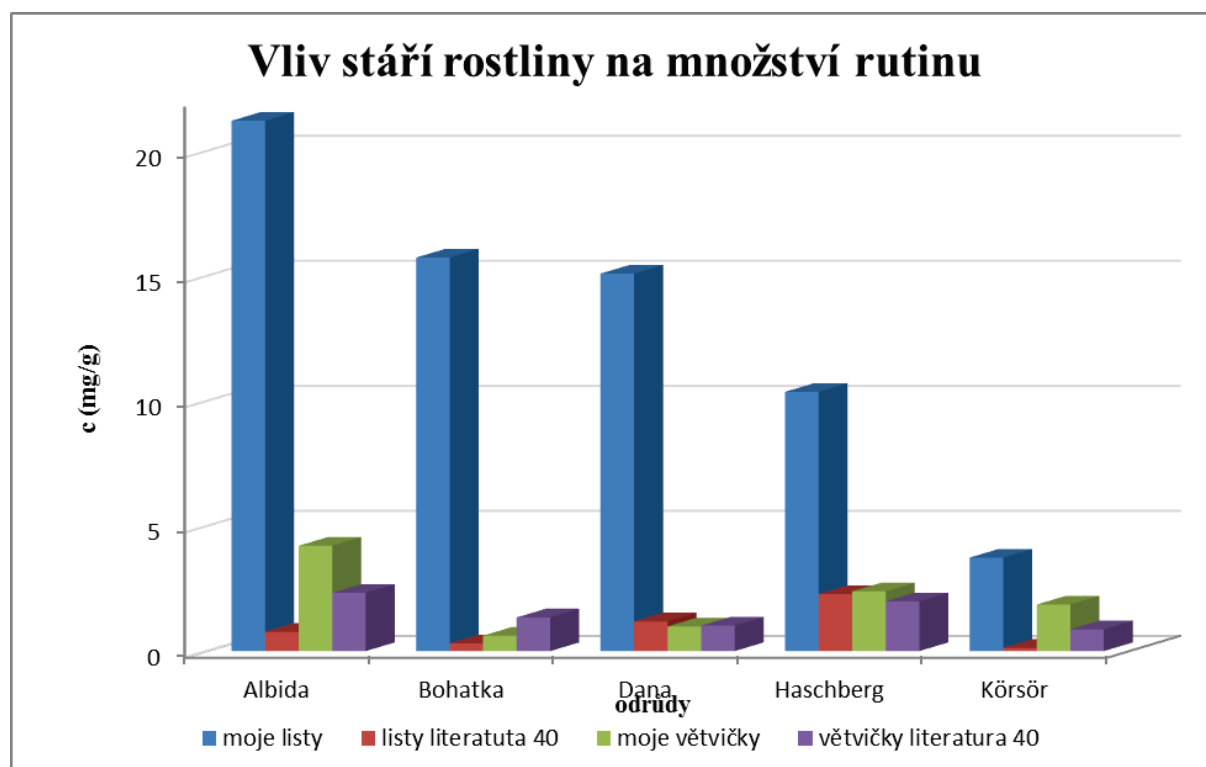
Pro určení významnosti obsahu rutinu ve větvičkách a listech 19 odrůd bezu černého bylo provedeno srovnání několika literárních zdrojů zabývajících se stanovením obsahu rutinu v jeho významných zdrojích jako je routa, pohanka, ale také v samotném bezu černém.

V literatuře<sup>40</sup> bylo provedeno stanovení rutinu v listech a větvičkách 5 šlechtěných odrůd bezu černého. Jednalo se o vzorky dodané opět Výzkumným a šlechtitelským ústavem ovocnářským v Holovousích. Větvičky a listy byly ostrihávány z mladých rostlin vstupujících do třetího vegetačního období. Byly to tytéž rostliny, ze kterých byly analyzovány v předkládané diplomové práci, ale o rok mladší. Tab. 14 obsahuje srovnání výsledků získaných vlastním měřením s výsledky získanými z literatury<sup>40</sup> z rostlin o rok mladších.

Tab. 14 Vliv stáří rostliny na množství rutinu

Vybrané odrůdy	Koncentrace rutinu (mg.g <sup>-1</sup> )			
	Listy r. 2010	Listy literatura <sup>40</sup>	Větvičky r. 2010	Větvičky literatura <sup>40</sup>
Albida	21,21	0,77	4,21	2,33
Bohatka	15,74	0,31	0,62	1,35
Dana	15,10	1,19	0,99	1,02
Haschberg	10,37	2,28	2,39	1,99
Körsör	3,74	0,13	1,86	0,87

Pro větší přehlednost byl sestaven i graf (Graf 8) znázorňující srovnání koncentrací naměřených a z literatury<sup>40</sup> vybraných odrůd.



Graf 8 Vliv stáří rostliny na množství rutinu

Při srovnání koncentrací rutinu ve větvičkách analyzovaných v rozmezí dvou let jsou vidět téměř zanedbatelné rozdíly. Přesto však došlo k viditelnému nárůstu, který potvrzuje možnost značného vlivu stáří rostliny na množství rutinu v jednotlivých částech rostliny. Při porovnání koncentrací rutinu u listů je vidět rapidní, pozitivní nárůst rutinu. Tato skutečnost je patrná z Grafu 8. Odrůda Albida u listů zaznamenala podle grafu nárůst rutinu o 96,4 % za rok. S tím souvisí patrně i příjem slunečního záření, který je z důvodu fotosyntézy u listů větší než u větviček. U tří z pěti srovnaných odrůd větviček došlo k nárůstu koncentrace rutinu ve větvičkách o rok starších, u zbylých dvou došlo k poklesu, avšak zanedbatelnému.

V literatuře<sup>74</sup> byla provedena ultrazvuková extrakce rutinu z routy (*Ruta graveolens* L.) a následná HPLC analýza s detekcí při 235 nm. Zjištěné množství rutinu v routě bylo  $1180 \pm 45,3$  mg/100g vzorku a  $840 \pm 23,6$  mg/100g vzorku. Na základě srovnání těchto skutečností s naměřenými daty se větvičky a listy bezu černého řadí k významným zdrojům rutinu a mohly by být také využívány například k přípravě doplňků stravy nebo být po požadované úpravě do stravy přidávány jako bohatý zdroj antioxidantů. Dále by přicházelo v úvahu jejich další využití v podobě ozdravných doplňků do koupelí, ať už do koupelí pro domácí použití, nebo například v lázních při ozdravných pobytech.

V literatuře<sup>60</sup> byla provedena PLE extrakce rutinu z listů, plodů a květů bezu černého (*Sambucus nigra* L.) s následnou HPLC analýzou a detekcí při 350 nm. PLE extrakce využila 2 teplot, 20°C a 100°C. Vyšších výtěžků bylo dosaženo při vyšší teplotě extrakce. Množství rutinu v jednotlivých částech bezu černého shrnuje Tab. 15.

Tab. 15 Srovnání koncentrací rutinu v jednotlivých částech bezu černého<sup>60</sup>

Část rostliny	PLE extrakce při 100°C
Listy	$16,7337 \pm 0,261$ (g/100g) $\times 10^{-2}$
Plody	$15,3875 \pm 0,194$ (g/100g) $\times 10^{-2}$
Květy	$202,078 \pm 2,102$ (g/100g) $\times 10^{-2}$

Při srovnání množství rutinu v listech ( $1,67$  mg/g) s hodnotami získanými stanovením rutinu v listech jednotlivých odrůd bylo i nejmenší naměřené množství u odrůdy Kōrsör ( $3,74$  mg.g<sup>-1</sup>) vyšší než hodnota uvedená v literatuře<sup>60</sup>. Při srovnání obsahu rutinu v květech ( $20,2$  mg.g<sup>-1</sup>) z použité literatury s hodnotami naměřenými v listech by obstála odrůda Pregarten ( $26,34$  mg.g<sup>-1</sup>), Weihenstephan ( $23,37$  mg.g<sup>-1</sup>), Samyl ( $22,86$  mg.g<sup>-1</sup>) i Albida ( $21,21$  mg.g<sup>-1</sup>). Po srovnání údajů z literatury<sup>60</sup> s koncentracemi naměřenými se dají i větvičky považovat za významný zdroj rutinu.

Všechny tyto skutečnosti nabádají k zamyšlení, zda by opravdu nebylo vhodné větvičky a listy, v dnešní době brány jako odpadní materiál, místo kompostování využívat k našemu prospěchu. Výsledky této diplomové práce dokazují, že by přinejmenším stálo za to se nad tím alespoň hluboce zamyslet.

V literatuře<sup>82</sup> byly porovnávány tři analytické metody (chromatografická, spektrofotometrická za použití AlCl<sub>3</sub>, spektrofotometrická dle AOAC; Assotiation of Official Analytical Chemists) pro stanovení obsahu rutinu v pohance tatarské. Pro analýzu byly

použity tři druhy pohanky (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn) lišící se původem. Rutin byl stanovován v celé rostlině, listech, stoncích a nažkách. Tab. 16 shrnuje množství rutinu nalezeného v listech tří druhů pohanek lišících se původem, dále srovnání metod použitých při analýze. Největší koncentrace rutinu byly nalezeny při použití spektrofotometrické metody s  $\text{AlCl}_3$ .

Tab. 16 Množství rutinu v listech tří druhů pohanky tatarské<sup>82</sup>

Vzorky listů jednotlivých druhů pohanek	Spektrofotom. s $\text{AlCl}_3$ (mg/g sušiny)	HPLC/UV (mg/g sušiny)	Spektrofotom. dle AOAC (mg/g sušiny)
A	42,95	19,42	28,41
B	37,06	22,14	29,54
C	38,41	21,04	31,44

Obsah rutinu v listech pohanky stanovený metodou HPLC/UV se pohyboval v rozmezí 19,42–22,14  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ . Tyto koncentrace jsou srovnatelné s hodnotami rutinu nalezenými v listech pěti na rutin nejbohatších odrůd bezu černého, a to jsou Pregarten (26,34  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ), Weihenstephan (23,37  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ), Samyl (22,86  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ), Albida (21,21  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) a Mammut (17,99  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ).

Výše uvedená čísla opět potvrzují, že listy některých odrůd bezu černého jsou jedním z největších zdrojů rutinu. Bylo by velmi přínosné je využívat pro jeho zdraví prospěšné vlastnosti v doplňcích stravy nebo přípravcích do ozdravných koupelí.

Literatura<sup>83</sup> popisuje stanovení obsahu rutinu v květech, plodech a listech bezu černého (*Sambucus nigra* L.). Jednotlivé části bezu černého byly extrahovány technikou ASE, po které následovala HPLC analýza s detekcí fotodiodovým polem a sledovaná při vlnové délce 350 nm.

Tab. 17 Obsah rutinu v *Sambucus nigra* L. podle literatury<sup>83</sup>

Část rostliny	ASE extrakce
Listy	0,2020 ± 0,0059 g/100g
Plody	0,1890 ± 0,0029 g/100g
Květy	2,8750 ± 0,0300 g/100g

Podle literatury<sup>83</sup> je obsah rutinu nalezený v květech srovnatelný s obsahem rutinu stanoveným v listech nejbohatších šlechtěných odrůd. Množství rutinu získané z listů a plodů je srovnatelné s obsahem rutinu zjištěným ve větvičkách. Jelikož se hodnoty rutinu obsažené v květech a plodech v použité literatuře<sup>83</sup> velmi podobají hodnotám rutinu v listech a větvičkách naměřených pro účely této diplomové práce, lze listy a větvičky bezu černého zařadit k významným potravinářským zdrojům rutinu, kterými doposud byly pouze květy a plody.

Na základě všech výše uvedených porovnání byly proměřené větvičky a listy 19 odrůd bezu černého testovaných v předkládané diplomové práci zhodnoceny jako velmi významný zdroj rutinu. Bylo by ekonomické je dále využívat pro utužení zdraví spotřebitelů a rozhodně by neměly být brány jako odpad.

## 5 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo stanovit množství rutinu v listech a větvičkách devatenácti odrůd bezu černého, srovnat naměřené hodnoty s významnými zdroji těchto flavonoidů a posoudit, zda je možné odrůdy bezu černého zařadit mezi významné zdroje rutinu, zda by tyto méně prozkoumané části rostliny mohly být v budoucnu použity například pro přípravu zdraví prospěšných doplňků stravy, popřípadě ozdravných koupelí v lázních.

V poslední době jsou zakládány sady se šlechtěnými odrůdami bezu černého s cílem jeho uznání jako ovocnářské odrůdy v ČR. Ve šlechtěném bezu totiž ubývá množství nebezpečného sambunigrinu obsaženého ve velkém množství v planém bezu. Plody a květy šlechtěných odrůd jsou využívány pro farmaceutické a potravinářské účely. Pozitivní vliv bezu černého na lidský organismus je přisuzován bioflavonoidům, z nichž nejvýznamnějším je rutin. Větvičky a listy bezu černého, které jsou každoročně stříhány pro omlazení keřů a dostatečné vyživení všech částí rostliny, jsou v současné době brány jako odpadní materiál. Aby mohly být tyto části bezu černého využity ku prospěchu lidí, protože se ví o pozitivních účincích celé rostliny na lidské zdraví, byl v nich stanoven rutin a srovnán s jinými významnými zdroji, s routou a pohankou.

Rutin byl získán z devatenácti šlechtěných odrůd bezu černého (Albida, Allesö, Aurea, Bohatka, Dana, Gerda, Heidegg 13, Haschberg, Körsör, Madona, Mammut, Pregarten, Riese aus Voßloch, Sambo, Sambu, Samdal, Sampo, Samyl, Weihenstephan). K oddělení léčivých rostlinných složek z buněčné matrice byla použita metoda extrakce stlačenou kapalnou horkou vodou (PHWE), která probíhala ve 3 cyklech po 5 minutách. Byla použita teplota 80°C, tlak 150 barů. Po extrakci následovalo přečištění přes SPE kolony a HPLC analýza s detekcí diodovým polem při vlnové délce 360 nm. Byla použita kolona SUPELCOSIL<sup>TM</sup> LC-8DB, mobilní fáze MeOH:H<sub>2</sub>O:HCOOH v poměru 36:61,5:2,5 s průtokem 1 ml.min<sup>-1</sup>.

Rutin byl stanoven ve všech devatenácti odrůdách, v listech i větvičkách. Nejvíce rutinu bylo obsaženo v listech odrůdy Pregarten, a to  $26,34 \pm 0,50$  mg.g<sup>-1</sup>, nejméně v listech odrůdy Körsör, který obsahoval  $3,74 \pm 0,13$  mg.g<sup>-1</sup> rutinu. U větviček bylo nejvyšší množství rutinu stanoveno u odrůdy Samyl, kde bylo naměřeno  $4,87 \pm 0,01$  mg.g<sup>-1</sup> rutinu. Nejnižší množství rutinu bylo stanoveno u odrůdy Heidegg 13, který obsahoval  $0,56 \pm 0,01$  mg.g<sup>-1</sup> rutinu.

Mez detekce pro rutin byla stanovena na  $6,3 \cdot 10^{-5}$  mg.ml<sup>-1</sup> a mez stanovitelnosti na  $2,1 \cdot 10^{-4}$  mg.ml<sup>-1</sup>.

Pro ověření zda jsou bezové listy a větvičky významným zdrojem rutinu, bylo provedeno stanovení rutinu v jeho všeobecně uznávaných bohatých zdrojích - v routě a pohance. V pohance bylo nalezeno  $11,09 \pm 0,08$  mg.g<sup>-1</sup> rutinu a v routě  $19,36 \pm 0,15$  mg.g<sup>-1</sup> rutinu. Pohanka a routa, které se řadí mezi významné zdroje rutinu, obsahují nižší koncentrace rutinu než u velké části analyzovaných listů odrůd bezu černého. I přesto jsou routa a pohanka uznávány jako bohaté zdroje rutinu, tutíž listy bezu černého patří také neodmyslitelně k těmto významným zdrojům rutinu.

Množství rutinu v listech bezu černého by mohlo být ovlivněno vegetačním obdobím, ve kterém byly posbírány. Listy pro účely této práce byly posbírány na konci vegetačního období a vzhledem k dosaženému množství rutinu se jeví toto období vhodným pro sběr. Jelikož obsah rutinu souvisí s UV zářením, je nejvhodnějším obdobím pro sběr rostlin právě konec vegetačního období, nikoliv začátek. Vzhledem k tomu, že listy bezu mají velkou plochu a obsahují velké množství chlorofylu, dá se předpokládat, že více slunečních paprsků dopadne právě na listy. Větvičky jsou těmito listy obklopeny, a tak průnik slunečních paprsků

k větvičkám je omezen. Tím by se dal vysvětlit významný rozdíl mezi množstvím rutinu v listech a větvičkách bezu černého. Přesto se i větvičky řadí k významnému zdroji rutinu.

Na obsah rutinu má vliv i stáří rostliny, které by mělo mít podle všeho výše zmíněného pozitivní vliv. Z tohoto důvodu bylo provedeno srovnání koncentrací rutinu naměřených u větviček a listů sestříhaných v rozmezí dvou let. Došlo k viditelnému nárůstu rutinu, obzvláště u listů, které potvrzuje možnost značného vlivu stáří rostliny na množství rutinu v jednotlivých částech rostliny. S tím souvisí patrně i příjem slunečního záření, který je z důvodu fotosyntézy u listů větší než u větviček.

Množství získaného rutinu závisí samozřejmě na matrici, ze které je získáván. Listy a větvičky bezu černého musely být před extrakcí rozdraceny, aby vznikla co nejvíce homogenní směs. Získání požadované velikosti vzorku bylo u větviček mnohem namáhavější, a to časově i fyzicky. To může mít také zásadní vliv na množství získaného rutinu.

Dalším srovnáním s literaturou zabývající se stanovováním rutinu, ať už v bezu černém, nebo v jeho významných zdrojích, lze větvičky a listy bezu černého zařadit k významným zdrojům rutinu a mohly by být také využívány například k přípravě doplňků stravy nebo být přidávány po požadované úpravě do stravy jako bohatý zdroj antioxidantů. Dále by přicházelo v úvahu jejich další využití v podobě ozdravných doplňků do koupelí, ať už do koupelí pro domácí užití, nebo například v lázních při ozdravných pobytech.

Na základě těchto poznatků byly analyzované větvičky a listy odrůd bezu černého vyhodnoceny jako významný zdroj rutinu a bylo by ekonomické je dále využívat pro utužení zdraví spotřebitelů a rozhodně by neměly být brány jako odpad.

## 6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

<sup>1</sup>HEMGESBERG, Hanspeter. *Černý bez: Léčivé rostliny pro zdraví.*: Fontána, 2002. 158 s. ISBN 80-86179-98-2.

<sup>2</sup>Bez černý. In *Celý svět* [online]., 2005 [cit. 2011-01-28]. Dostupné z WWW: <<http://www.celysvet.cz/fotky-bez-cerny-foto-obrazky?rr=3>>.

<sup>3</sup>VYMAZAL, Miloš Rostliny: Sambucus nigra-bez černý-keře listnaté, opadavé. In *Garden.cz* [online]., 2001 [cit. 2011-01-28]. Dostupné z WWW: <<http://www.garten.cz/a/cz/2659-sambucus-nigra-bez-cerny/>>. ISSN 1803-0033.

<sup>4</sup>ANDREJEV, Sergej; BARINOV, Viktor. *Lékárna na dosah ruky*. Vyd. 1. Praha: Lidové nakladatelství, 1987. 192 s. ISBN 26-040-87.

<sup>5</sup>TRÍSKA, Jan. *Evropská flóra*. Praha: Artia, 1979. 299 s. ISBN 37-002-79.

<sup>6</sup>VĚTVIČKA, Václav. *Stromy a keře*. Vyd. 2. Praha: Aventinum, 2005. 288 s. ISBN 80-7151-254-0.

<sup>7</sup>OPLETAL, Lubomír; KREJČA, Jindřich; VOLÁK, Jan. *Rostliny pro zdraví*. Vyd. 1. Praha: Aventinum, 1999. 176 s. ISBN 80-7151-074-2.

<sup>8</sup>VEBERIC, Robert, et. al. European elderberry (*Sambucus nigra* L.) rich in sugars, organic acids, anthocyanins and selected polyphenols. *Food Chemistry*. 2009, 114, s. 511–515.

<sup>9</sup>VELÍŠEK, Jan; HAJŠLOVÁ, Jana. *Chemie potravin II.* Vyd. 3. Tábor: OSSIS, 2009. 644 s. ISBN 978-80-86659-16-9.

<sup>10</sup>VELGOSOVÁ, M.; VELGOS, Š. *Naše Liečivé Rastliny*. Vyd. 1. Bratislava: Slovenské pedagogické nakladateľstvo, 1988. 386 s. ISBN 067-027-88.

<sup>11</sup>KOVÁCS, Zsuzsanna Flavonoidy, antokyanidíny. In [online]., [cit. 2011-01-28]. Dostupné z WWW: <[http://www.flavin7.sk/dl/Dokumentumok/flavin7\\_antocianidiniiek\\_sk.pdf](http://www.flavin7.sk/dl/Dokumentumok/flavin7_antocianidiniiek_sk.pdf)>.

<sup>12</sup>SLANINA J., TÁBORSKÁ E. Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. *Chem.Listy*. 2004, 98, s. 239-245.

<sup>13</sup>DE RIJKE, E., et al. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*. 2006, 1112, s. 31-63.

<sup>14</sup>HOLLMAN, P.C.H., KATAN, M.B. Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man. *Arch. Toxicol*. 1998, 20, s. 237-248.

- 15**HERGOT M.G.L., HOLLMAN P.C.H., VEMENA D.P. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *J. Agric. Food Chemistry*. 1999a, 40 (9), s. 1591-1598.
- 16**HOLLMAN P.C.H., HERGOT, M.G.L., KATAN, M.B. Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chemistry*. 1996, 57 (1), s. 43-46.
- 17**RHODES M.C.J., PRICE K.R. Identification and analysis of plant phenolic antioxidants. *Eur. J. Cancer Prev.* 1997, 6, s. 518-521.
- 18**HÄSSIG A., LIANG W.X., SCHWABI H., STAMPFLI K. Flavonoids and tannins: plant-based antioxidants with vitamin character. *Med. Hypotheses*. 1999, 52(5), s. 479-481.
- 19**HERGOT M.G.L., HOLLMAN P.C.H., KATAN M.B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *Food Chemistry*. 1992b, 40, s. 2379-2383.
- 20**BRIDLE, P.; TIMBERLAKE, C.F. Anthocyanins as natural food colours-selected aspects. *Food Chemistry*. 1997, 58, 1-2, s. 103-109.
- 21**KARAKAYA, S., NEHIR EL, S. Quercetin, luteolin, apigenin and keamferol contents of same foods. *Food Chemistry*. 1999, 66, s. 289-292.
- 22**DLUGOŠOVÁ, Katarína; PŠENÁKOVÁ, Ivana. *Antioxidačné účinky vybraných sekundárnych metabolitov*. Nova Biotechnologica, 2004. 27-40 s. ISBN 80-89034-79-9.
- 23**Flavonoids. In *Phytochemicals* [online]., [cit. 2011-01-28]. Dostupné z WWW: <<http://www.phytochemicals.info/phytochemicals/flavonoids.php>>.
- 24**Flavonoidní antioxidanty a askorbová kyselina cibule. In *Agrární www portál* [online]., 28.03.2000 [cit. 2011-01-28]. Dostupné z WWW: <<http://www.agris.cz/vyhledavac/detail.php?id=83280&iSub=518>>.
- 25**JIRÁSEK, V.; STARÝ, F. *Atlas léčivých rostlin*. Praha: SPN, 1986. 368 s.
- 26**Kvercetin. In *Phytochemicals* [online]., [cit. 2011-01-28]. Dostupné z WWW: <<http://www.phytochemicals.info/phytochemicals/quercetin.php>>.
- 27**Kvercetin. In *Informační centrum bezpečnosti potravin* [online]., [cit. 2011-01-28]. Dostupné z WWW: <<http://www.agronavigator.cz/az/vis.aspx?id=92407>>.
- 28**HOLLMAN, P.C.H., et al. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man, *Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters*. 1997, 418, s. 152-156.

**29**Rutin. *Bio-life.cz* [online]. 2008., [cit. 2011-01-28]. Dostupné z WWW: <<http://www.bio-life.cz/clanky/zdrave-potraviny/pohanka-je-lek.html>>.

**30**Rutin. In *Phytochemicals* [online]., [cit. 2011-01-28]. Dostupné z WWW: <<http://www.phytochemicals.info/phytochemicals/rutin.php>>.

**31**ČOPÍKOVÁ, Jana, et al. Přírodní barevné látky. *Chemické listy*. 2005, 90, s. 802-816.

**32**Doplňky stravy a potravní doplňky. In *Státní zemědělská a potravinářská inspekce* [online]., 30. 09. 2007, 2011 [cit. 2011-03-07]. Dostupné z WWW: <<http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1004570&docType=ART&nid=11431&chnum=2>>.

**33**Rutin jako doplněk stravy. In *Seznamzbozi.cz* [online], 2004 [cit. 2011-02-01]. Dostupné z WWW: <<http://www.seznamzbozi.cz/?q=rutin&m=f&f=10>>.

**34**Rutin jako doplněk stravy. In *LÉKÁRNA PARIŽSKÁ*, 2009 [cit. 2011-02-01]. Dostupné z WWW: <[http://www.lekarnapariszka.cz/advanced\\_search\\_result.html?keyword=rutin&search\\_in\\_description=1](http://www.lekarnapariszka.cz/advanced_search_result.html?keyword=rutin&search_in_description=1)>.

**35**HEIM, Kelly E.; TAGLIAFERRO, Anthony R.; BOBILYA, Dennis J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2002, 13, s. 572-584.

**36**MUROTA, K., TERAJO, J. Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2003, 417, s. 12-17.

**37**ANDLAUER, W., STUMPF, C., FURST, P. Intestinal absorption of rutin in free and conjugated forms. *Biochemical Pharmacology*. 2001, 62, s. 369-374.

**38**COOK, N. C., SAMMAN, S. Flavonoids – chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J. Nutr. Biochem.* 1996, 7, s. 66 – 76.

**39**ŠTULÍK, Karel, et al. *Analytické separační metody*. Vyd. 1. Praha : Karolinum, 2005. 264 s. ISBN 80-246-0852-9.

**40**GRULICHOVÁ, H., *Extrakce vybraných flavonoidů bezu černého pro potravinářské účely*. Brno, 2010. 67 s. Diplomová práce. VUT v Brně.

**41** Pressurized Solvent Extraction . In *Applied Separations* [online]., 2010 [cit. 2011-01-28]. Dostupné z WWW: <<http://www.appliedseparations.com/pse/>>.

**42**GRULICHOVÁ, H., *Využití techniky PSE (extrakce rozpouštědlem za zvýšeného tlaku a teploty) v analýze potravin*. Brno, 2008. 47 s. Bakalářská práce. VUT v Brně.

- 43**PSE. In *LABICOM, s.r.o.* [online], 1997 [cit. 2011-02-16]. Dostupné z WWW: <<http://www.labicom.cz/pse-42/>>.
- 44**Teoa, Chin Chye, et. al., Pressurized hot water extraction (PHWE), *Journal of Chromatography A*. 2010, 1217, s. 2484-2494.
- 45**ŠTULÍK, Karel. Vysokoúčinné analytické separace biologicky aktivních látek. In [online]. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, katedra analytické chemie, 2006 [cit. 2011-01-28]. Dostupné z WWW: <<http://www.vscht.cz/anl/paci/PAC/prezentace/separace.pdf>>.
- 46**VESPALCOVÁ, Milena. Extrakce pevnou fází. In *Jakost v laboratorní a kontrolní praxi* [online]. VUT Brno, 2010 [cit. 2011-04-04]. Dostupné z WWW: <<https://www.vutbr.cz/elearning/course/view.php?id=95568>>.
- 47**LÓPEZ-BLANCO C., et. al. Solid phase extraction-gas-chromatographic method to determine free cholesterol in animal fats, *J. good Compos. Anal.* 2005, 18, s. 617-624.
- 48**KYONK-SU, Kima, JEONG-MIN, Leeb, CHEUL-HEE, Hongc. Solid phase extraction (SPE) method for detection of irradiated meats, *Lebensm. Wiss. Technol.* 2004, 37, s. 559-563.
- 49**SHIMELIS O., AURANC C., TRINH A. Fractionation of *cis/trans* FAMES using Discovery AG-Ion SPE. *Analytix*. 2006, 2, s. 18-19.
- 50**MAJEWSKA, Malgorzata, et al. Solid phase extraction in food analysis. *Food Chemistry and Biotechnology*. 2008, 72, 1029, s. 5-13.
- 51**ŠTULÍK, Karel; PACÁKOVÁ, Věra. *Vysokoúčinná kapalinová chromatografie*. Praha: SPN, 1986.
- 52**COUFAL, Pavel. High Performance Liquid Chromatography. In *High Performance Liquid Chromatography*, 28.7.2004 [cit. 2011-02-25]. Dostupné z WWW: <<http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>>.
- 53**L.A. BERRUETA, B. Abad-García, et al. Optimization and validation of a methodology based on solvent extraction and liquid chromatography for the simultaneous determination of several polyphenolic families in fruit juices. *Journal of Chromatography A*. 2007, 1154, s. 87-96.
- 54**CHURÁČEK, Jaroslav. *Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod*. Vyd. 1. Praha: Akademie věd ČR, 1993. 387 s. ISBN 80-200-0010-0.
- 55**CHURÁČEK, J.; JANDERA, P. *Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie*. Vyd. 1. Praha: SNTL, 1984. 192 s. ISBN 04-607-85.

**56**KARDOŠ, E.; BEREK, D. *Základy kvapalinovej chromatografie*. Vyd. 1. Bratislava: Alfa, 1979. 269 s. ISBN 63-023-79.

**57**HPLC. In *Instrumentace HPLC* [online]., [cit. 2011-02-25]. Dostupné z WWW: <<http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/hypertext/200620/hypertext/BOAJALB.htm>>.

**58**DEINEKA, V. I.; GRIGOR'EV, A. M.; STAROVEROV, V. M. HPLC analysis of flavonoids: determining rutin in plant extracts . *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2004, 38, 9, s. 23–25.

**59**MOLNÁR-PERL, I.; FÜZFAI, Zs. Chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrochromatographic techniques in the analysis of flavonoids. *Journal of Chromatography A*. 2005, 1073, s. 201-227.

**60**DAWIDOWICZ, Andrzej L.; WIANOWSKA, Dorota; BARANIAK, Barbara. The antioxidant properties of alcoholic extracts from Sambucus nigra L. (antioxidant properties of extracts). *LWT*. 2006, 39, s. 308-315.

**61**FANG, Fang, et al. Determination of red wine flavonoids by HPLC and effect of aging. *Food Chemistry*. 2007, 101, s. 428-433.

**62**WACH, Anna; PYRZYNSKA, Krystyna; BIESAGA, Magdalena. Quercetin content in some food and herbal samples. *Food Chemistry*. 2007, 100, s. 699–704.

**63**TANG, Daoquan , et al. Simultaneous chemical fingerprint and quantitative analysis of Ginkgo biloba extract by HPLC–DAD. *Anal Bioanal Chem*. 2010, 396, s. 3087–3095.

**64**DOBIÁŠ, Petr, et al. Comparison of pressurised fluid and ultrasonic extraction methods for analysis of plant antioxidants and their antioxidant capacity. *Central European Journal of Chemistry*. 2010, 8(1), s. 87–95.

**65**LIU, Qian ; CAI, Wensheng; SHAO, Xueguang. Determination of seven polyphenols in water by high performance liquid chromatography combined with preconcentration. *Talanta*. 2008, 77, s. 679–683.

**66**BIESAGA, Magdalena; OCHNIK, Urszula; PYRZYNSKA, Krystyna. Fast analysis of prominent flavonoids in tomato using a monolithic column and isocratic HPLC. *J. Sep. Sci.*. 2009, 32, s. 2835 – 2840.

**67**PENG, Lin, et al. Ultrasonically Assisted Extraction of Rutin from *Artemisia selengensis* Turcz: Comparison with Conventional Extraction Techniques. *Food Anal. Methods* . 2010, 3, s. 261–268.

**68**KENJERIČ, Daniela, et al. Flavonoid pattern of sage (*Salvia officinalis* L.) unifloral honey. *Food Chemistry*. 2008, 110, s. 187-192.

<sup>69</sup>MICHALKIEWICZ, Anna; BIESAGA, Magdalena; PYRZYNSKA, Krystyna. Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey. *Journal of Chromatography A*. 2008, 1187, s. 18–24.

<sup>70</sup>DENG, Shixin , et al. Simultaneous characterisation and quantitation of flavonol glycosides and aglycones in noni leaves using a validated HPLC-UV/MS method. *Food Chemistry*. 2008, 111, s. 526–529.

<sup>71</sup>NOVAKA, Ivana, et al. Ultrasound extracted flavonoids from four varieties of Portuguese red grape skins determined by reverse-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Analytica chimica acta* . 2008, 630, s. 107–115.

<sup>72</sup>QIAN, Zheng-Ming, et al. Simultaneous Qualitation and Quantification of Thirteen Bioactive Compounds in Flos Lonicerae by High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector and Mass Spectrometry. *Chem. Pharm. Bull.*.2007, 55(7) , s. 1073—1076.

<sup>73</sup>CARERI, M., et al. Spectrophotometric and coulometric detection in the highperformance liquid chromatography of flavonoids and optimization of sample treatment for the determination of quercetin in orange juice. *Journal of Chromatography A*. 2000, 881, s. 449–460.

<sup>74</sup>ADAM, Martin, et al. Extraction of antioxidants from plants using ultrasonic methods and their antioxidant capacity. *J. Sep. Sci.*. 2009, 32, s. 288 – 294.

<sup>75</sup>CHEN, Xiao-qing; XIAO, Jian-bo. RP-HPLC-DAD Determination of Flavonoids: Separation of Quercetin, luteolin and Apigenin in Marchantia Convolvata. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2005, 3, s. 175-181.

<sup>76</sup>KREFT, I.; FABJAN, N.; YASUMOTO, K. Rutin content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) food materials and products. *Food Chemistry* . 2006, 98, s. 508–512.

<sup>77</sup>MAULUDIN, Rachmat ; MÜLLER, Rainer H.; KECK, Cornelia M. Development of an oral rutin nanocrystal formulation. *International Journal of Pharmaceutics* . 2009, 370, s. 202–209.

<sup>78</sup>Historie, vznik ústavu. In *Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o.* [online]., 2005 [cit. 2011-02-17]. Dostupné z WWW: <<http://www.vsuo.cz/index.php?page=20>>.

<sup>79</sup>DOUŠA, Michal. Mez detekce a mez stanovitelnosti. In *Validační program pro statistické zpracování analytických dat* [online]., 1999 [cit. 2011-04-04]. Dostupné z WWW: <<http://www.hplc.cz/>>.

**80**BENTHIN, Björn; DANZ, Henning; HAMBURGER, Matthias. Pressurized liquid extraction of medicinal plants. *Journal of Chromatography A*. 1999, 837, s. 211–219.

**81**SAMO, KREFT, et al. Rutin in buckwheat herbs grown at different UV-B radiation levels: comparison of two UV spectrophotometric and an HPLC Metod. *Journal of Experiment Botany*. 2002, 53, 375, s. 1801-1804.

**82**LENKA, Štočková, et al. Porovnání výsledků tří analytických metod pro stanovení obsahu rutinu v pohance tatarské. *Chem. listy*. 2009, 103, s. 827-831.

**83**DAWIDOWICZ, Andrzej L., et al. Optimization of ASE Conditions for the HPLC Determination of Rutin and Isoquercetin in *Sambucus nigra* L.. *Journal of Chromatography and Related technologies*. 2003, 26, 14, s. 2381-2397.

## 7 SEZNAM POUŽÍTÝCH ZKRATEK

PSE	(pressurized solvent extraction) extrakce rozpouštědlem za zvýšeného tlaku a teploty
ASE	zrychlená extrakce rozpouštědlem
PFE	kapalinová extrakce za zvýšeného tlaku
PLE	tlaková kapalinová extrakce
PHWE	(pressurized hot water extraction) extrakce horkou vodou za zvýšeného tlaku a teploty
SPE	(solid phase extraction) extrakce na pevné fázi
RP-HPLC	(reversed-phase high-performance liquid chromatography) vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi
GC	plynová chromatografie
UV-VIS	ultrafialové a viditelné záření
DAD	detekce diodovým polem
PAD	(PhotoDiode Array detection) detekce fotodiodovým polem
MS	hmotnostní spektrometrie
HCOOC	kyselina mravenčí
H <sub>2</sub> O	voda
MeOH	methanol

## **8 SEZNAM PŘÍLOH**

- P 1 Rutin jako doplněk stravy
- P 2 Vzorek větvičky a listů odrůdy Madona bezu černého
- P 3 Vzorke analyzované pohanky a routy
- P 4 Plnění patrony
- P 5 Doplnování PHWE extraktu na objem 50 ml
- P 6 Vzorke naředěné v poměru 2:3 (methanol:voda) před čištěním mikrofiltrem
- P 7 Čištění vzorku před nástřikem přes mikrofiltr
- P 8 Průměrné koncentrace, směrodatné odchylky a intervaly spolehlivosti odrůd
- P 9 Chromatogram odrůdy Pregarten z listí
- P 10 Chromatogram odrůdy Allesö z listí
- P 11 Chromatogram odrůdy Bohatka z listí
- P 12 Chromatogram pohanky s retenčním časem rutinu
- P 13 Chromatogram routy s retenčním časem rutinu
- P 14 3D chromatogram odrůdy Körsör z listí (modrá) a z větví (černá)
- P 15 Chromatogram odrůdy Samyl z větví

## 9 PŘÍLOHY

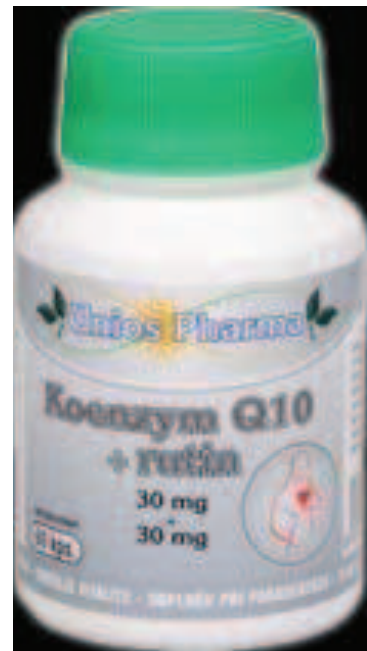
P 1 Rutin jako doplněk stravy





COPYRIGHT PEARS HEALTH CYBER





COPYRIGHT PEARS HEALTH



P 2 Vzorek větvičky a listů odrůdy Madona bezu černého



P 3 Vzorky analyzované pohanky a routy



P 4 Plnění patrony



P 5 Doplnování PHWE extraktu na objem 50 ml



P 6 Vzorok naředěné v poměru 2:3 (methanol:voda) před čištěním mikrofiltrem



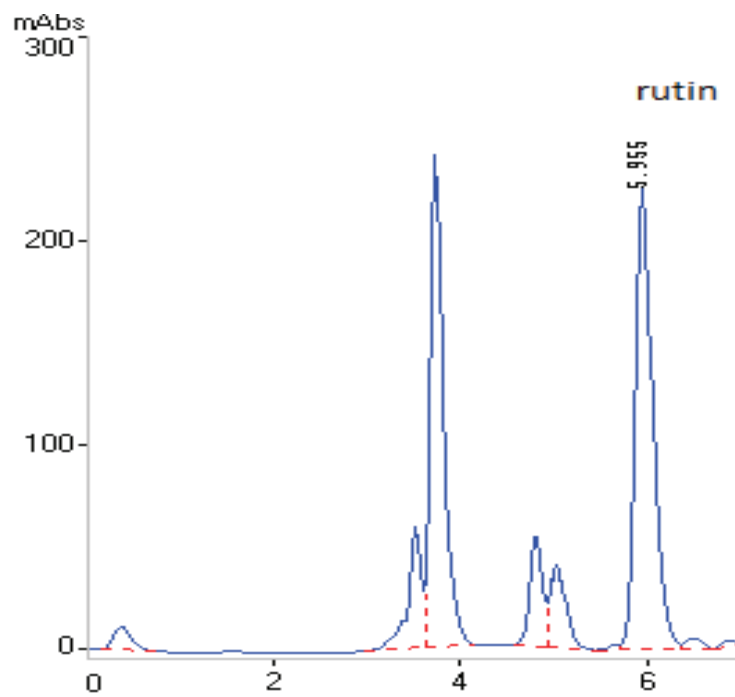
P 7 Čištění vzorku před nástřikem přes mikrofiltr



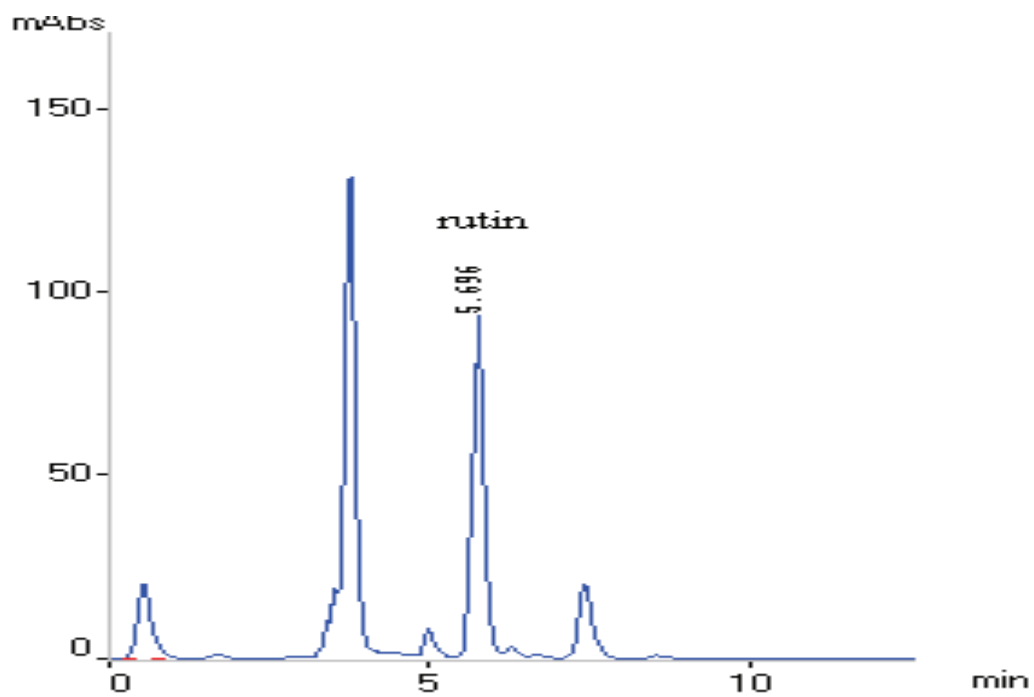
P 8 Průměrné koncentrace, směrodatné odchylky a intervaly spolehlivosti obsahu rutinu v analyzovaných odrůdách bezu

odrůda	průměrná koncentrace (mg/g)	směrodatná odchylka	interval spolehlivosti
listy			
Albida	21,21	0,41	0,46
Allesö	9,49	0,17	0,19
Aurea	12,13	0,34	0,39
Bohatka	15,74	0,45	0,51
Dana	15,10	0,24	0,28
Gerda	11,00	0,34	0,39
Heidegg 13	14,02	0,44	0,50
Haschberg	10,37	0,06	0,07
Körsör	3,74	0,13	0,15
Madona	7,61	0,81	0,18
Mammut	17,99	0,43	0,48
Pregarten	26,34	0,50	0,56
Riese aus Voßloch	16,81	0,39	0,45
Sambo	16,18	0,43	0,49
Sambu	12,54	0,25	0,28
Samdal	16,33	0,64	0,72
Sampo	17,44	0,14	0,15
Samyl	22,86	0,72	0,82
Weihenstephan	23,37	0,50	0,56
větvičky			
Albida	4,21	0,13	0,15
Allesö	2,13	0,06	0,07
Aurea	1,77	0,06	0,07
Bohatka	0,62	0,02	0,02
Dana	0,99	0,03	0,03
Gerda	1,97	0,05	0,06
Heidegg 13	0,56	0,01	0,01
Haschberg	2,39	0,08	0,09
Körsör	1,86	0,10	0,11
Madona	2,00	0,09	0,10
Mammut	1,47	0,03	0,03
Pregarten	1,93	0,02	0,02
Riese aus Voßloch	1,54	0,02	0,02
Sambo	1,11	0,04	0,04
Sambu	1,50	0,03	0,04
Samdal	1,68	0,07	0,07
Sampo	2,15	0,08	0,09
Samyl	4,87	0,01	0,01
Weihenstephan	3,08	0,10	0,11

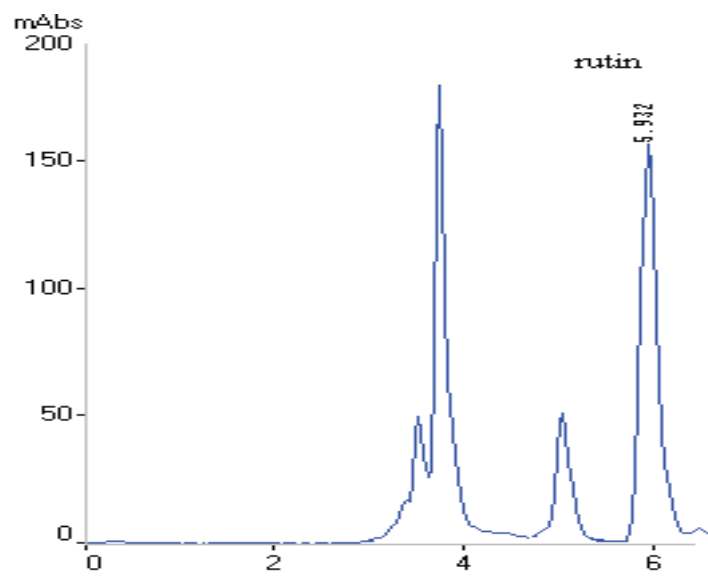
P 9 Chromatogram odrůdy Pregarten z listí



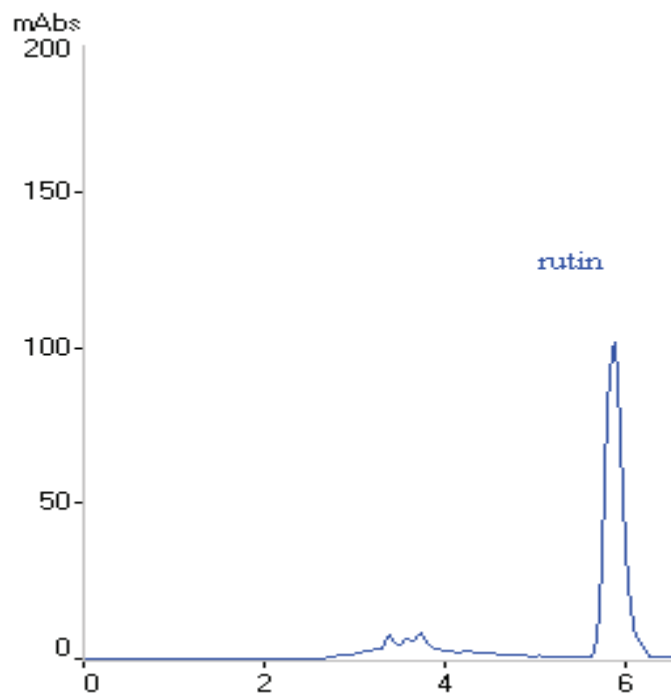
P 10 Chromatogram odrůdy Allesö z listí



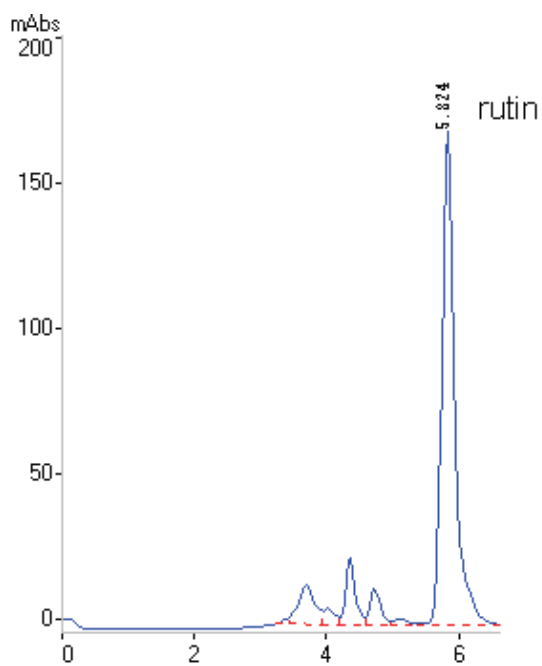
P 11 Chromatogram odrůdy Bohatka z listí



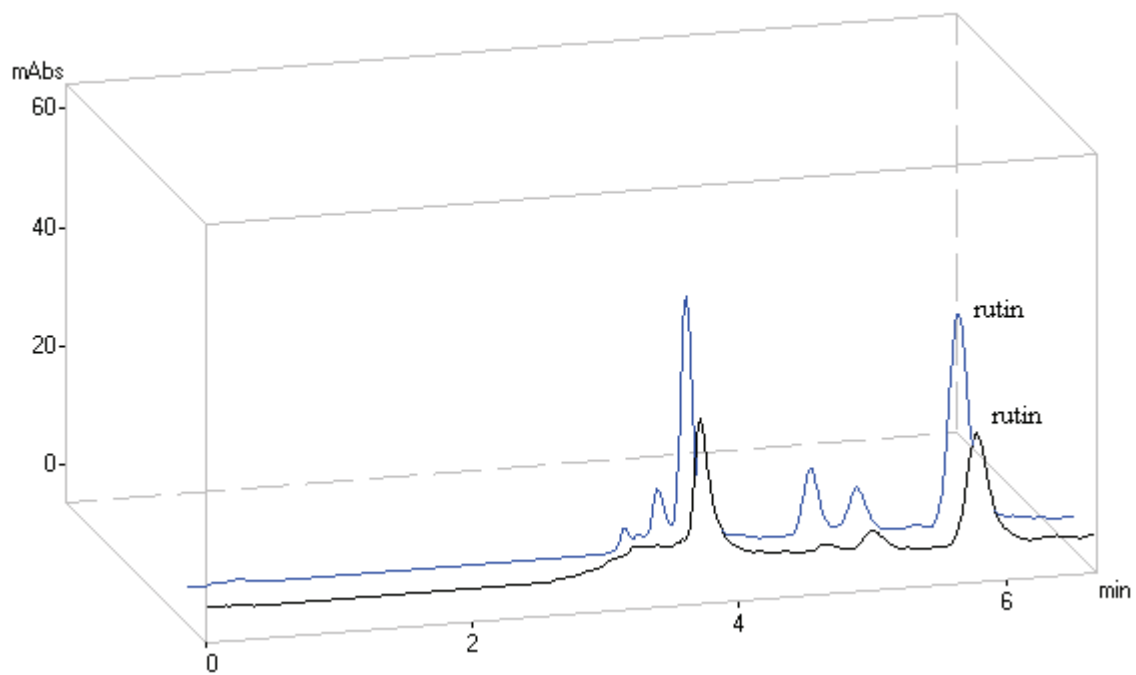
P 12 Chromatogram pohanky s retenčním časem rutinu



P 13 Chromatogram routy s retenčním časem rutinu



P 14 3D chromatogram odrůdy Körsör z listí (modrá) a z větví (černá)



P 15 Chromatogram odrůdy Samyl z větví

