

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

PEDAGOGICKÁ FAKULTA

KATEDRA APLIKOVANÉ CHEMIE A UČITELSTVÍ CHEMIE

Diplomová práce

**OBSAH VYBRANÝCH FENOLICKÝCH LÁTEK
V NĚKTERÝCH ZÁSTUPCÍCH RODŮ
CHENOPODIUM L. A ATRIPLEX L.**

Zdeňka Děkanová

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Eva Dadáková, Ph.D.**

České Budějovice 2010

Ráda bych poděkovala vedoucí práce Ing. Evě Dadákové, Ph.D. za cenné rady, připomínky, trpělivost a porozumění, s nímž mě při této práci vedla.

Dále děkuji Ing. Tamaře Pelikánové za pomoc při zpracování vzorků a RNDr. Naděždě Vrchotové, CSc. za poskytnutí výsledků z HPLC.

Zároveň děkuji všem ostatním, kteří se jakkoliv podíleli na dokončení této práce.

Tato práce byla vypracována za podpory projektu MSM 6007665806 a
GAČR 525/05/2546.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci na téma Obsah vybraných fenolických látek v některých zástupcích rodů *Chenopodium* L. a *Atriplex* L. jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

.....

V Českých Budějovicích
dne 20. 4. 2010

I. OBSAH

I. OBSAH	1
Seznam zkratek.....	4
Souhrn.....	5
Summary.....	6
II. ÚVOD	7
III. TEORETICKÁ ČÁST	8
1. Rostlinné metabolity.....	8
1.1 Charakteristika sekundárních metabolitů rostlin	8
1.2 Přehled vybraných fenolických látek	9
1.3 Fenolické kyseliny	10
2. Flavonoidy	10
2.1 Biosyntéza flavonoidů	11
2.2 Chemická stavba flavonoidů	11
2.3 Klasifikace a výskyt flavonoidů	12
2.4 Vlastnosti flavonoidů.....	14
2.4.1 Role flavonoidů v rostlinách.....	15
2.4.2 Vliv flavonoidů na zdraví člověka.....	15
3. Chenopodoideae – merlíkovité.....	17
3.1 Charakteristika čeledi	17
3.1.1 Amaranthaceae	17
3.1.2 Chenopodoideae	17
3.2 Lebeda lesklá	18
3.2.1 Charakteristika druhu	18
3.2.2 Využití	19
3.3 Lebeda rozkladitá	20
3.3.1 Charakteristika druhu	20
3.3.2 Využití	21
3.4 Lebeda hrálovitá	21

3.4.1 Charakteristika druhu	21
3.5 Lebeda zahradní.....	22
3.5.1 Charakteristika druhu	22
3.5.2 Využití	22
3.6 Merlík bílý	23
3.6.1 Charakteristika druhu	23
3.6.2 Využití	23
3.7 Merlík zvrhlý	24
3.7.1 Charakteristika druhu	24
3.8 Merlík mnohosemenný	25
3.8.1 Charakteristika druhu	25
3.9 Špenát setý.....	26
3.9.1 Charakteristika druhu	26
3.9.2 Využití	27
4. Analytické metody.....	28
4.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	28
4.2 Kapilární elektroforéza (CE)	29
4.2.1 Varianty kapilární elektroforézy.....	30
4.2.2 Kapilární zónová elektroforéza	31
4.2.3 Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MEKC).....	32
IV. CÍLE PRÁCE	32
V. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34
1. Odběr rostlinného materiálu	34
2. Úprava rostlinného materiálu	35
3. Použité chemikálie a standardy	35
4. Laboratorní sklo a přístroje.....	35
5. Příprava roztoků pro MECC.....	36
6. Metodika stanovení pro MECC.....	37
6.1 Stanovení celkového kvercetinu metodou MECC.....	37
6.2 Stanovení rutinu metodou MECC	38

6.3 Měření na kapilární elektroforéze.....	39
7. Metodika stanovení fenolických látek metodou HPLC.....	39
VI. DISKUSE	41
1. Stanovení fenolických látek metodou HPLC	41
1.1 Analýza fenolických sloučenin v květenstvích rodu <i>Chenopodium</i>	42
1.2 Analýza fenolických sloučenin v listech rodu <i>Chenopodium</i>	43
1.3 Analýza fenolických sloučenin v květenstvích rodu <i>Atriplex</i>	43
1.4 Analýza fenolických sloučenin v listech rodu <i>Atriplex</i>	44
1.5 Analýza fenolických sloučenin v listech rodu <i>Spinacia</i>	45
1.6 Přehled stanovených fenolických látek metodou HPLC.	46
2. Stanovení obsahu celkového kvercetinu metodou MECC	47
3. Stanovení obsahu rutinu metodou MECC	49
VII. ZÁVĚR	51
VIII. SEZNAM LITERATURY	52
IX. PŘÍLOHY	56

Seznam zkratek

CZE	kapilární zónová elektroforéza
DAD	detektor s diodovým polem
GC	plynová chromatografie (Gas Chromatography)
HPLC	vysokoučinná (vysokotlaká) kapalinová chromatografie (High - Performance (Pressure) Liquid Chromatography)
LC	kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography)
LDL	lipoproteiny s nízkou hustotou
MECC	micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography)
SDS	sodiumdodecylsulfate, laurylsíran sodný
TLC	chromatografie na tenké vrstvě (Thin Layer Chromatography)

Souhrn

Práce se věnuje obsahu vybraných fenolických látek v některých zástupcích rodů *Chenopodium* L. a *Atriplex* L. Fenolické látky se nacházejí v rostlinách ve vysokém množství a široké variabilitě. Flavonoidy jsou malou ale velmi významnou skupinou fenolických látek. Konzumací přírodních flavonoidů se předchází vzniku chronických chorob, jako jsou ateroskleróza, kardiovaskulární a nádorová onemocnění. Pro snadnou dostupnost a výjimečné biologické účinky byla speciální pozornost věnována dvěma flavonoidům, kvercetin a rutin.

Pro stanovení obsahu fenolických látek byly použity dvě nezávislé analytické metody a to metoda micelární elektrokinetické kapilární chromatografie (MECC) a metoda vysoceúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Analyzovány byly dva kulturní druhy rodu *Spinacia* a *Atriplex*, tři volně rostoucí druhy zástupců rodu *Chenopodium* a tři volně rostoucí druhy zástupců rodu *Atriplex*. Analyzovány byly listy a květenství jednotlivých druhů rostlin.

Metodou MECC byl stanoven obsah celkového kvercetin a rutin. Nejvyšší obsah celkového kvercetin byl stanoven v listech lebedy zahradní (4240 mg/kg sušiny), nejnižší obsah celkového kvercetin byl stanoven v květenství lebedy hrálovité (19,6 mg/kg sušiny). Rutin byl stanoven pouze ve čtyřech vzorcích, ostatní vzorky obsahovaly rutin pod mezí stanovitelnosti. Nejvyšší obsah rutin byl nalezen v listech merlíku bílého (868 mg/kg sušiny).

Metodou HPLC bylo zjištěno kvalitativní zastoupení fenolických látek. Výsledkem jsou jednotlivé chromatografické profily rostlinných druhů. Byla prokázána přítomnost velkého množství fenolických látek.

Klíčová slova: fenolické látky, flavonoidy, kvercetin, rutin, vysoceúčinná kapalinová chromatografie, micelární elektrokinetická kapilární chromatografie, *Chenopodium*, *Atriplex*

Summary

The thesis deals with measuring the content of chosen phenolic substances in some specimen of the genera *Chenopodium* L. and *Atriplex* L. Large quantities and a wide variety of phenolic substances are found in plants. Flavonoids are a small but significant subgroup of phenolic substances. Consumption of natural flavonoids prevents chronic diseases, like atherosclerosis, cardiovascular and tumorous diseases. Due to their easy availability and exceptional biological effects, special attention was paid to two flavonoids: quercetin and rutin.

Two independent analytical methods were used to determine the content of phenolic substances, namely the Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography (MECC) method and the High - Performance Liquid Chromatography (HPLC) method. Two cultured species of the genera *Spinacia* and *Atriplex*, three freely growing specimen of the genus *Chenopodium* and three freely growing species of the genus *Atriplex* were analysed. The analysis concerned the leaves and the inflorescence of these species.

The total content of quercetin and rutin was determined by the MECC method. The highest total content of quercetin was found in the leaves of the Garden Orache (4240 mg/kg of dry matter), the lowest total content of quercetin was found in the inflorescence of the *Atriplex prostrata* DC. (19.6 mg/kg of dry matter). Rutin was only found in four samples, the rest of the samples contained rutin in quantities below the limit of quantification. The highest content of rutin was found in the leaves of the Lamb's Quarters (868 mg/kg of dry matter).

The qualitative representation of phenolic substances was determined using the HPLC method. The results are individual chromatographic profiles of the species. The presence of high amounts of phenolic substances was demonstrated.

Keywords: phenolic substances, flavonoids, quercetin, rutin, High - Performance Liquid Chromatography, Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography, *Chenopodium*, *Atriplex*

II. ÚVOD

Merlíky (*Chenopodium* L.) a lebedy (*Atriplex* L.) patří do skupiny rostlin označovaných jako plevely. Najdeme je na okrajích cest, rumišťích, v polích i zahradách. Dříve byly běžnější součástí jídelníčku, semena sloužila našim předkům jako náhražka obilovin a mladé listy nadzemní části rostliny pak jako zelenina do salátu či vařené ve formě špenátu. Lebedy a merlíky obsahují vysoké množství fenolických látek, které jsme se pokusili kvalitativně i kvantitativně stanovit.

Jako analytická metoda pro tuto práci byla zvolena metoda vysoceúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a metoda micelární elektrokinetické kapilární chromatografie (MECC). Metoda HPLC je pro stanovení fenolických látek a flavonoidů využívána ve vysoké míře. Předností této metody je její vysoká citlivost, přesnost a možnost analyzovat vzorky malých koncentrací. Metoda MECC je méně častá, přestože přináší mnohé výhody, jako je krátká doba analýzy a vysoká rozlišovací schopnost. Důvodem je menší rozšíření této analytické metody.

Fenolické látky patří mezi sekundární metabolity rostlin a jsou pro rostliny zdrojem mnoha specifických biologických účinků a vlastností. Mohou například zastávat stavební a strukturální funkci v buňkách, zvyšují schopnost kompetice mezi druhy nebo se může jednat o ochranné a signální látky.

Významnou skupinou fenolických látek z hlediska pozitivních účinků na lidské zdraví jsou flavonoidy. Poslední studie příznivý vliv flavonoidů na lidský organismus potvrzují. Konzumace potravin s vysokým obsahem flavonoidů slouží jako prevence a léčba rakoviny a chrání proti ateroskleróze. Jak uvádí Hertog (1993) je dostatečný příjem flavonoidů a ostatních polyfenolů vyváženou stravou spojen s nižším výskytem onemocnění cév a srdce.

III. TEORETICKÁ ČÁST

1. Rostlinné metabolity

Rostliny jako autotrofní organismy jsou schopny vytvářet si pro svou potřebu veškeré organické látky. Vzniklé prekurzory jsou dále upravovány podle potřeby v metabolických drahách. Podle funkce, kterou v organismu plní, rozdělujeme vzniklé metabolity na primární a sekundární. Mezi primární metabolity rostlin patří látky, jako jsou lipidy, sacharidy, jednoduché karboxylové kyseliny, 20 základních proteinogenních aminokyselin, nukleové kyseliny a některé deriváty těchto látek.

1.1 Charakteristika sekundárních metabolitů rostlin

Sekundární metabolity, jak název napovídá, mají původ v tzv. sekundárním metabolismu (specializovaném metabolismu), který je úzce provázán s metabolismem primárním. Sekundární metabolity se však nepodílejí přímo na růstu a vývoji rostliny. Pro organismy, které je vytváří, nejsou tyto látky životně nezbytné. Dříve se soudilo, že se jedná o látky odpadní. Poslední výzkumy však dokazují, že mnohé sekundární metabolity mají významnou roli v životě rostlin. Jedná se o chemické látky, které rostlině především zvyšují její konkurenceschopnost a přinášejí výhody. Tyto látky se však všeobecně nevyskytují, jsou pro konkrétní druhy často dokonce specifické.

Rostliny syntetizují sekundární metabolity jako odpověď na různé stresové vlivy prostředí (např. změny intenzity světelného spektra, teplotní změny, kompetice mezi rostlinami, ohrožení herbivory a mikrobiálními patogeny). Z mnoha výzkumů vyplývá, že sekundární metabolity ovlivňují schopnost přežití a reprodukce rostlin. Navíc jsou často funkčně unikátní na druhové úrovni. Obsah specifických látek dal často základ nomenklatuře rostlin. Mezi sekundární metabolity patří terpenické látky, alkaloidy, fenolické látky a polyaminy (Berhow a Vaughn, 1999).

Primárním a sekundárním metabolismus rostlin nemá ostré hranice. Při určování, zda látka patří do skupiny primárních či sekundárních metabolitů mohou nastat obtíže, například někteří zástupci sacharidů patří mezi primární metabolity, ale jiné se již řadí mezi metabolity sekundární.

1.2 Přehled vybraných fenolických látek

Předpokládá se, že úspěšná adaptace rostlin na souš je důsledkem jejich schopnosti tvořit různorodé fenolické látky. Jedná se zejména o oligo- a polymerní fenolické látky či kombinované s látkami jiného biogenního původu. Je to rozmanitá skupina látek, které mají značně různorodé vlastnosti a biologické účinky.

Fenoly posloužily rostlinám jako stavební a strukturní složky, dále jako ochranné a signální látky, vonné, chuťové a barevné látky květů a plodů aj. Mnohé z nich mají důležitou roli jak z hlediska chemoekologického, tak i farmakologického. Většina těchto sekundárních metabolitů je produktem šikimátové (fenylypropanové) a fenylypropanoidacetátové biosyntetické dráhy. K jejich nejpočetnějším a nejvýznamnějším zástupcům patří lignany, flavonoidy, kumariny, fenolické kyseliny a stilbeny (Harmatha, 2005).

Nejběžnější typy rostlinných fenolických látek lze klasifikovat například podle počtu uhlíků a jejich vzájemných vazeb (Harmatha, 2002):

Tabulka 1. Klasifikace fenolických látek podle počtu uhlíků

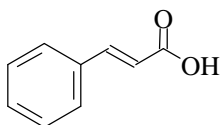
Složení	Počet uhlíků	Typy fenolických látek	Příklady
C_6	6	jednoduché fenoly, benzochinony	catechol, hydrochinon
$C_6 - C_1$	7	fenolické kyseliny / aldehydy	kyselina salicylová
$C_6 - C_2$	8	acetofenony, benzofurany	isobenzofuranon
$C_6 - C_3$	9	fenylpropanoidy, benzopyrany (kumariny)	chromen
$C_6 - C_4$	10	naftochinony	juglon, plumbagin
$C_6 - C_5$	11	ageratochromeny (prekoceny)	prekocen I, II
$(C_6)_2$	12	dibenzofurany, dibenzochinony, bifenyly	difenyleter
$C_6 - C_1 - C_6$	13	dibenzopyrany, benzofenony, xantony	difenylmetan, fluoren
$C_6 - C_2 - C_6$	14	stilbeny, anthrachinony, fenantreny	resveratrol, emodin
$C_6 - C_3 - C_6$	15	flavonoidy, izoflavony, chalkony, aurony	kvercetin, genistein
$C_6 - C_4 - C_6$	16	norlignany (difenylbutadieny)	hinokiresinol
$C_6 - C_5 - C_6$	17	norlignany (conioidy)	sugiresinol
$(C_6 - C_3)_2$	18	lignany, neolignany	
$(C_6 - C_3 - C_6)_2$	30	biflavonoidy	amentoflavon
$(C_6 - C_3 - C_6)_n$	n	kondenzované taniny (flavolany)	gallotaniny, ellagitaniny
$(C_6 - C_3)_n$	n	ligniny	
$(C_6)_n$	n	catecholmelaniny	rostlinné pigmenty

1.3 Fenolické kyseliny

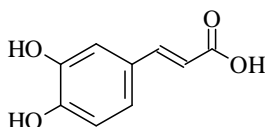
Fenolické kyseliny jsou přítomné v řadě potravin a tvoří přibližně jednu třetinu polyfenolů v potravě. V naší stravě jsou fenolické kyseliny zastoupeny především hydroxyskořicovými kyselinami, převážně ve formě esterů. Nejčastěji je to kyselina kávová a její estery, dále pak kyselina ferulová.

Obrázek 1. Vzorce fenolických kyselin

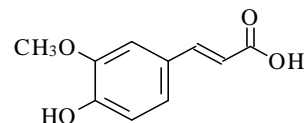
kyselina skořicová



kyselina kávová

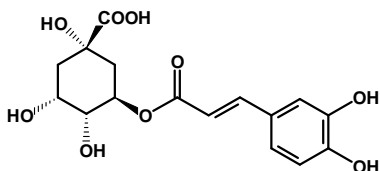


kyselina ferulová



Nejběžnějším esterem kávové kyseliny je kyselina chlorogenová (5-caffeoylchinová kyselina), která je přítomná v řadě druhů ovoce a zeleniny a v kávě. Šálek kávy obsahuje 50-150 mg kyseliny chlorogenové. Kromě kávy jsou bohatým zdrojem též brambory, jablka, hrušky, meruňky, broskve (Slanina a Táborská, 2004).

Obrázek 2. Vzorec chlorogenové kyseliny



2. Flavonoidy

Flavonoidy jsou fenolické látky známé pro své antioxidační účinky. Pozornost přitahují zejména pro svůj příznivý vliv na lidský organismus. Lidé stejně jako ostatní zvířata nejsou schopni syntetizovat aromatické sloučeniny s benzenovým kruhem z alifatických prekurzorů. Z tohoto důvodu musejí být tyto organické antioxidanty přijímány potravou (Hässig et al., 1999).

2.1 Biosyntéza flavonoidů

Flavonoidy, stejně jako ostatní fenolické látky, vznikají z primárních metabolitů sacharidů dvěma základními mechanismy. Jedná se o *acetátový mechanismus*, který se uplatňuje při tvorbě fenolických sloučenin u nižších rostlin, zatímco *mechanismus kyseliny šikimové* se podílí na vytváření fenolických sloučenin vyšších rostlin. Oba mechanismy se pak společně uplatní při syntéze složitějších polyfenolických látek jako jsou flavonoidy.

Flavonoidy obsahují dva benzenové cykly, z nichž první kruh /A/ vzniká cestou polyacetátovou, druhý kruh /B/ opět cestou šikimátu (Pavel, 1989).

Flavonoidy jsou deriváty 1,3-difenylypropanu, resp. 1,2-difenylypropanu. Syntéza probíhá tak, že triacetyl-CoA přenesený pomocí specifického proteinového nosiče na příslušnou transferázi se sloučí s p-hydroxyfenylypyruvát. Vzniká tak triketometylenový kruh, který pak přejde tautomerně na kruh floroglucinový. Výsledkem je molekula prekurzoru flavonoidů, tzv. chalkon (Pavel, 1989).

Dráhy jednotlivých syntéz jsou v buňce vysoce regulovány a kontrolovány. Kontroly probíhají na úrovni enzymové syntézy či degradace, enzymové aktivace nebo inhibice (Berlow a Vaughn, 1999). V přílohách je zařazeno barevné schéma znázorňující variabilitu biosyntetických cest flavonoidů (Příloha 1).

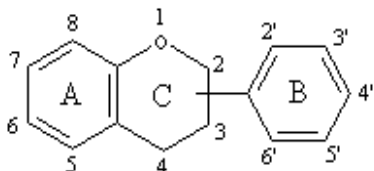
2.2 Chemická stavba flavonoidů

Flavonoidy jsou chemické sloučeniny patřící do rozsáhlé skupiny rostlinných fenolů. Dnes do této skupiny flavonoidních látek neboli flavonoidů řadíme více jak 4000 zástupců a stále jsou objevovány další. Základem struktury je flavan (Obrázek 2) skládající se ze dvou benzenových jader (A, B) spojených heterocyklickým 2-fenylybenzopyronem (C). Hydroxylové a keto- skupiny, substituované na tuto základní strukturu, odlišují jednotlivé skupiny flavonoidů.

Přírodní flavonoidy mají nejčastěji podobu O-glykosidů, jejich molekula je tedy tvořena cukernou částí a částí necukernou část (aglykonem). Vazbou s cukrem se auxochromní skupiny flavonoidů inaktivují, takže v rostlině jsou někdy tyto glykosidy bezbarvé a zbarvení se projeví teprve po hydrolýze (Pavel, 1989). Volné flavonoidy se vyskytují pouze zřídka. Při technologickém zpracování při vyšších teplotách a v kyselém

prostředí může docházet k hydrolyze glykosidů a vzrůstu koncentrace aglykonů (Davídek, 1983).

Obrázek 3. Vzorec flavanu



2.3 Klasifikace a výskyt flavonoidů

Winkel-Shirley (2001) dělí bohatou rodinu flavonoidů se do šesti hlavních skupin (1. -6.) a tří menších podskupin (7. – 9.):

1. Chalkony (obr. 3a)

2. Flavony (obr. 3b)

3. Flavonoly (obr. 3c)

4. Flavanony (obr. 3d)

5. Anthokyaniny (obr. 3e)

6. Taniny

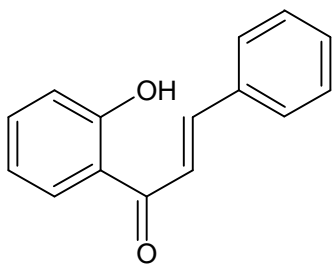
7. Aurony (obr. 3f)

8. Isoflavonoidy (obr. 3g)

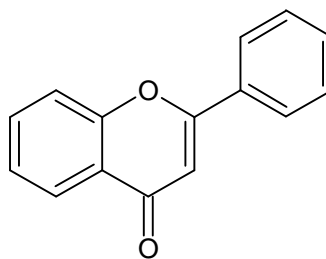
9. Stilbeny

Obrázek 4. Chemické struktury některých skupin flavonoidů

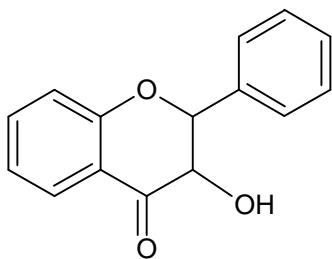
a) chalkony



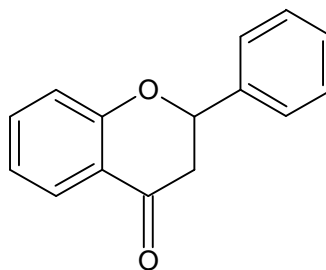
b) flavony



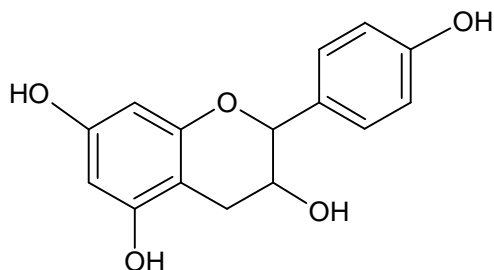
c) flavonoly



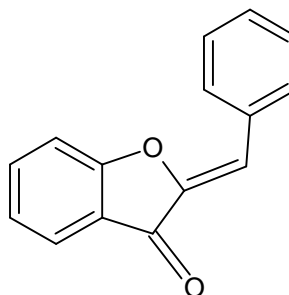
d) flavanony



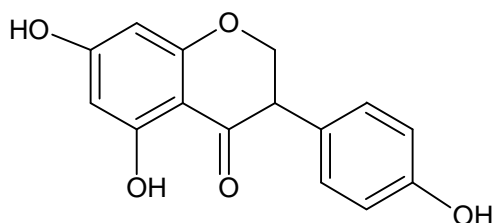
e) antokyaniny



f) aurony



g) isoflavonoidy



Nejvýznamnější flavonoidy jsou flavony, izoflavony, antokyanidy a katechiny, které se v rostlinách vyskytují jako glykosidy.

Mezi nejvýznamnější zástupce **flavonolů** patří kemferol, kvercetin, rutin a myricetin. Od nich jsou odvozeny další hydroxyderiváty.

Dominantní flavonoid ve výživě člověka je flavonol **kvercetin**. Kvercetin se nachází ve vysokých koncentracích v běžně přijímaných potravinách jako cibule (300 mg/kg čerstvé váhy), jablka (21-72 mg/kg), kapusta (100 mg/kg), červené víno (4-16 mg/l) a zelený a černý čaj (10-25 mg/l) (Trna a Táborská). V těchto zdrojích se nachází jednak ve formě volné, zejména je ale vázán s cukernými jednotkami, např. jako kvercetin-3-O-glukosid, kvercetin-4'-O-glukosid, kvercetin-3-O-rhamnosid. **Rutin** (kvercetin-3-O-rhamnoglukosid) je součástí léků používaných jako venofarmaka. Snižuje permeabilitu a fragilitu kapilár.

Flavonové deriváty se nazývají **anthoxantiny**. Vyskytují se v rostlinách buď volné, častěji jako diglykosidy, vázány na glukózu přes hydroxyl v poloze 3,5, popř. i na galaktózu, rhamnózu, rutinózu apod. (Pavel, 1989). Mezi antoxantiny dále patří např. rutin, rhamnoglukosid kvercetinu. Flavonony byly prokázány hlavně v ovoci jako například grapefruity či pomeranče.

Anthokyaniny jsou modrá, fialová a červená barviva květů, plodů i jiných částí rostlin. Jejich aglykony jsou antokyanidy, deriváty γ -pyranu. Vyskytují se v rostlinných buňkách výhradně jako glykosidy.

Příbuzné antokyanům jsou bezbarvé **katechiny**, prekurzory některých tříslovin. Snadno přechází v amorfní floroglucinové taniny. Ty spolu s katechiny a depsidy tvoří třídu tříslovin. Mají svíravou chuť, srázejí proteiny, alkaloidy a jiné látky z vodných roztoků tím, že tvoří s nimi těžko rozpustné komplexy.

Taniny se nacházejí se v čaji, oříškách, vyskytují se i v čokoládě. Mají velmi pozitivní vliv na kardiovaskulární systém.

Isoflavonoidy jsou přítomné hlavně v luštěninách. Příkladem je medicarpin – hlavní fytoalexin, produkováný vojtěškou setou (*Medicago sativa*) jako reakce na infekci patogenními houbami.

Stilbeny, úzce příbuzné s flavonoidy, byly prokázány v révě (*Vitis vinifera*), borovici (*Pinus sylvestris*) a podzemnici olejné (*Arachis hypogaea*).

2.4 Vlastnosti flavonoidů

Flavonoidy působí jako účinné antioxidanty. Jejich antioxidační aktivita je závislá na počtu a poloze hydroxylových skupin v molekule, vliv má i jejich glykosylace. Optimální radikálově likvidační vlastnosti byly nalezeny pro *o*-dihydroxy strukturu v kruhu B, dvojnou vazbu mezi uhlíky 2 a 3 (C2-C3) a 4-oxo funkční skupinu v kruhu C a 3 a 5 -OH skupiny na kruzích A a C. Flavonoly, jako je např. kvercetin, spojují tyto vlastnosti, likvidují hyperoxidové anionty (O_2^-), hydroxyradikály, lipidové peroxyradikály a tvoří cheláty s některými ionty kovů (Fe^{2+} , Cu^{2+}) (Cook a Samman, 1996).

Jednotlivé skupiny flavonoidů nemají v rostlinách stejnou fyziologickou funkci. To se projevuje na další funkci flavonoidů, mohou působit jako inhibitory nebo stimulatory růstu.

2.4.1 Role flavonoidů v rostlinách

Rostliny se musí bránit vůči nepříznivým vnějším podmínkám, k tomu jim slouží uzpůsobení jejich povrchu těla a také produkce široké škály sekundárních metabolitů. Ty udělují rostlinám různé výhody, mají vliv na odezvu rostliny vůči stresu (například střídání světla nebo teplot), kompetici mezi rostlinnými druhy, ovlivňují herbivorní tlaky a omezují patogenní útoky. Zdá se, že ovlivňují i schopnost přežití a reprodukci (Berhow a Vaughn, 1999).

Flavonoidy jsou často funkčně unikátní na druhové úrovni, tzn. že strukturně odlišné sloučeniny jsou odpovědné za stejné funkce u rozdílných druhů. Díky této vlastnosti lze využít stanovení typu a složení obsažených flavonoidů u příbuzných druhů k taxonomickému určování. Navíc každá rostlina produkuje a uchovává různé flavonoidy v závislosti na stádiu růstu, reprodukci, části rostlinného pletiva, typu enviromentálního stresu nebo patogennímu útoku (Berlow a Vaughn, 1999).

2.4.2 Vliv flavonoidů na zdraví člověka

Flavonoidy jsou fermentací střevními bakteriemi uvolněny z vyšších struktur a spolu s ostatními složkami potravy vstřebány. V organismu jsou působením příslušných enzymů převedeny na mnohem rozpustnější sulfáty nebo glukuronidy. Převážně ve formě konjugátů jsou pak vyloučeny močí, zhruba jedna desetina je vyloučena jako čisté (nekonjugované) flavonoidy. Vrcholu koncentrace v krvi dosahují flavonoidy zhruba 4 hodiny po konzumaci rostlinné potravy, po 24 hodinách koncentrace klesá k nule - v těle člověka ani hospodářských zvířat se neakumulují (Hampl a Lapčák, 1996).

Soudí se, že účinky flavonoidů v lidském těle jsou přínosné pro lidské zdraví. Na tento fakt ukazují mnohé epidemiologické studie srovnávající výskyt chorob v různých zemích: Francouzi například mnohem méně trpí kardiovaskulárními chorobami než Američané. Nádorová onemocnění prsu a prostaty ohrožují Evropany a Američany více než Japonce. Příčiny rozdílů mezi populacemi mohou být různé. Svou roli určitě budou hrát klimatické podmínky, čistota životního prostředí, dědičnost (Hampl a Lapčák, 1996). Kvalitu zdraví ale krom toho výraznou měrou ovlivňuje i životní styl a charakter stravy. Zvýšený příjem červeného vína, které je bohaté na polyfenoly, je jedním z možných

vysvětlení „francouzského paradoxu“, tedy relativně vysokým přísunem tuků v potravě a nízkou mortalitou na kardiovaskulární onemocnění ve Francii (Renaud a De Lorgeril, 1992, Stanley a Maizer, 1999).).

Díky svým chemickým vlastnostem mají flavonoidy různorodý vliv na děje probíhající v organismu člověka. Důležité jsou zejména jejich **antioxidační vlastnosti**, kdy flavonoidy působí jako lapače radikálů, některé jsou navíc schopny vázat do komplexů ionty přechodných kovů. Tím dochází k změně dostupnosti těchto kovů při redoxních reakcích, kde působí jako katalyzátory. To má vliv na výstelku cév či snižuje mutagenitu a kancerogenitu řady cizorodých látek v těle. Flavonoidy s antioxidační aktivitou zabraňují oxidaci krevních lipidů, zejména chrání svým účinkem frakci LDL – lipoproteiny s nízkou hustotou. Brání tak vzniku aterosklerózy a trombotických onemocnění (Goldberg et al., 2003). Je prokázáno, že dostatečný příjem flavonoidů a ostatních polyfenolů vyváženou stravou je spojen s nižším výskytem onemocnění cév a srdce (Hertog et al., 1993).

Mezi další vlastnosti flavonoidů patří **inhibice enzymů**. Jedna a tatáž látka může inhibovat více různých enzymů. Jevy pozorované na tkáňové úrovni jsou pak způsobeny kombinací jednotlivých účinků na úrovni enzymové. Některé flavonoidy jsou schopny **interakce s hormonálními receptory**. Někdy s nimi reagují ve stejném smyslu, jindy účinky přirozených hormonů ruší.

V rostlinných materiálech se přirozeně vyskytují častěji a ve vyšší koncentraci pouze některé flavonoidy, patří mezi ně i flavanol kvercetin. Jeho antioxidační schopnosti jsou díky jeho chemické struktuře výjimečné (Cook a Samman, 1996). Kvercetin je účinnějším antioxidantem než vitamin C a E. Zároveň ale nesmíme opomenout i jeho prooxidační vlastnosti, které kvercetin, stejně jako některé ostatní flavonoidy, vykazuje. Podle nejnovějších výzkumů se zdá, že alkylace hydroxyskupiny v poloze 7 zvyšuje záchyt radikálů a naopak jeho deriváty s volnými hydroxyskupinami mající v části molekuly strukturu pyrokatecholu a navíc s volnou hydroxyskupinou v poloze 3 mohou za určitých okolností vykazovat prooxidační aktivitu. Pro zablokování této aktivity by neměla být posledně zmíněná hydroxyskupina volná, jako je tomu například u rutinu, jehož konzumace by byla tudíž výhodnější (Dadáková et al., 2003).

Studie potvrzují, že flavonoidy se významně podílejí na prevenci onemocnění objevujících se v souvislosti s oxidačním poškozením biomembrán. Jedná se především o kardiovaskulární onemocnění, nádorová onemocnění a také záněty (Hertog, 1995).

Výsledky různých studií naznačují, že populace s vyšším obsahem flavonolů a flavonů v potravě je charakterizována nižší průměrnou úmrtností na koronární srdeční choroby.

Byl studován vliv konzumace potravin obsahující flavonoidy na rakovinu. Kvercetin omezuje počet a místo nádorů v určitých zvířecích modelech, ale u lidí tato spojitost nebyla nalezena. Je možné, že nádory u lidí nejsou zapříčiněny stejnými typy a dávkami karcinogenů jako ve zvířecích studiích, nebo jsou antikarcinogenní efekty flavonolů a flavonů významné pouze ve velmi vysokých dávkách. Kvercetin pravděpodobně tedy nehraje hlavní roli ve vysvětlení ochranného efektu zeleniny a ovoce proti rakovině. Výjimkou je cibule, kde obsažený kvercetin snižuje riziko rakoviny žaludku (Hertog, 1995).

3. Chenopodoideae – merlíkovité

Jedná se o podčeď dvouděložných rostlin z řádu hvozdíkotvaré zahrnující na 110 rodů s 1500 druhy. Při poslední úpravě taxonomického systému APG III, který byl publikován v říjnu 2009, byla čeď merlíkovité (*Chenopodiaceae*) vřazena do čeledi laskavcovitých (*Amaranthaceae*).

3.1 Charakteristika čeledi

3.1.1 Amaranthaceae

Do čeledi *Amaranthaceae* podle Květeny ČR (Hejný a Slavík, 1990) patří jednoleté i vytrvalé byliny, se střídavými listy nebo vstřícnými celistvými listy bez palistů. Květy jsou jednotlivě nebo ve složených květenstvích, plodem je tobolka nebo nažka. Čeď zahrnuje 174 rodů a asi 2050 druhů, které jsou rozšířené po celém světě.

3.1.2 Chenopodoideae

Bývalá čeď *Chenopodiaceae* – merlíkovité obsahuje 100 rodů a až 1500 druhů kosmopolitních bylin. Má silné tendence k druhotnému šíření (Hejný a Slavík, 1990). Najdeme zde zástupce halofilní (rostliny vyhledávající stanoviště s vysokým obsahem soli), nitrofilní (rostliny náročné na dusík) a ruderalní. Mnohé druhy jsou xerofytní (Welsh,

2003). Do této podčeledi náleží také ekologicky ostře vyhraněné druhy se svérázným metabolismem.

Jsou to jednoleté, dvouleté i vytrvalé byliny nebo polokeře. Mají jednoduché listy bez palistů, střídavé nebo vstřícné. Květy jsou drobné, většinou jednodomé a oboupohlavné. Umístěny jsou jednotlivě nebo ve vrcholičnatém květenství tvořícím u mnoha druhů v úžlabí listenů klubička. Někdy vytváří složená květenství (laty nebo klasy). Vytrvalé okvětí, nejčastěji pětičetné, obklopuje plod, kterým bývá nažka (Hejný a Slavík, 1990).

Mnoho zástupců této čeledi je hojně využíváno v různých odvětvích lidské činnosti. Patří sem rostliny krmivářsky a potravinářsky významné (*Betula vulgaris*, *Chenopodium quinoa*, *Spinacea oleracea*) (Welsh, 2003), rostliny důležité v lékařství (*Chenopodium ambrosioides*, *Dysphania ambrosioides* a *Salsola collina*).

Merlíky (druhy rodu *Chenopodium*) jsou převážně jednoleté byliny. Vyhledávají často ruderalní stanoviště, kde nejsou omezovány konkurenčně silnějšími vytrvalými druhy a kde mají dostatek světla. Některé druhy merlíků jsou velmi hojné, jiné jsou vzácné nebo dokonce v České republice ohrožené. K těm druhům patří např. merlík slanomilný (*Ch. chenopodioides*), merlík hroznový (*Ch. botrys*), merlík zední (*Ch. murale*), merlík smrdutý (*Ch. vulvaria*) nebo merlík městský (*Ch. urbicum*) (Fajmon a Simonová, 2008).

Tabulka 2: Zařazení zmíněných druhů do botanického systému

Třída	<i>Magnoliopsida</i> – dvouděložné		
Řád	<i>Caryophyllales</i> – hvozdíkotvaré		
Čeleď	<i>Amaranthaceae</i> - laskavcovité		
Podčeleď	<i>Chenopodoideae</i> Burnett - merlíkovité		
Rod	<i>Chenopodium</i>	<i>Atriplex</i>	<i>Spinacia</i>
Druh	Merlík zvrhlý	Lebeda rozkladitá	Špenát setý
	Merlík mnohosemenný	Lebeda zahradní	
	Merlík bílý	Lebeda lesklá	
		Lebeda hrálovitá	

3.2 Lebeda lesklá

Atriplex sagittata BORKH.

3.2.1 Charakteristika druhu

Jedná se o jednoletou, 1-2 m vysokou bylinu. Lodyha je přímá, zpravidla bohatě větvená a proužkovaná. Listy rostliny jsou řapíkaté, čepel v obrysu trojúhelníkovitá,

zvláště při bázi laločnatě zubatá, se svrchní stranou leskle tmavozelenou a spodní bíle pomoučenou. Lebeda lesklá má květy uspořádané v bohaté květenství lichoklasu. Samičí květy jsou dvojího typu: většinou s krovkami špičatě vejčitými, velkými, bez zubů a výstupků, mezi nimi jsou vtroušeny květy bez krovek, zato však s 4-5četným okvětím. Tento typ květů má u nás už jen pěstovaná lebeda zahradní. Plody jsou nažky, jichž může být na jedné rostlině až několik set tisíc. Kvete od července do září.

Roste na ruderalních plochách, na hlinitých navážkách, kompostech, na okrajích polí a cest, na půdách bohatých dusíkem, kyprých, holých, nesnáší konkurenci a zastínění. V České republice je tento druh nepůvodní, trvale zdomácnělá, v teplejších oblastech státu hojná, v chladnějších pahorkatinách se vyskytuje jen roztroušeně (max. asi 650 m n.m.). Celkově roste ve střední a jihovýchodní Evropě, v Malé, Střední a Přední Asii, na jihozápadní Sibiři, na východě po Altaj, druhotně i na jihu Afriky.

3.2.2 Využití

Mladé listy jsou jedlé, chuti podobné zelenému hrášku, lze je použít na salát nebo do polévek; v lidové medicíně se užívala čerstvá nať při záchvatech dny a proti střevním parazitům.

Obrázek 5. Lebeda lesklá (*Atriplex sagittata* BORKH.) (podle Híska, 2005)



3.3 Lebeda rozkladitá

Atriplex patula L.

3.3.1 Charakteristika druhu

Jedná se o jednoletý pozdní jarní plevelný druh s proměnlivým vzhledem. Lodyha je zpravidla 20-80 cm vysoká, přímá, vzpřímená až k zemi přitisklá. Spodní listy jsou podlouhle kosočtverečné a s klínovitou bází, svrchní listy jsou podlouhle kopinaté. Vyskytují

se jednopohlavné květy. Rozmnožuje se pouze generativně. Na jedné rostlině dozrává až několik tisíc nažek. Nažky mají velmi proměnlivou dormanci a klíčí nepravidelně v průběhu celého roku, zvláště při vyšších teplotách půdy. Kvete od července do října.

Rozšíření lebedy rozkladité je hojné, zejména na polích, zahradách a rumišťích. U nás je pravděpodobně původní nebo snad archeofyt. Je nejrozšířenějším druhem rodu *Atriplex* v polních podmínkách, zapleveluje všechny plodiny, zejména však okopaninu a různé druhy zeleniny (Hron a Kohout, 1988).

3.3.2 Využití

Mladé rostliny jsou křehké a šťavnaté, již od starověku se z listů lebedy rozkladité připravovaly saláty, možno je konzumovat i jako špenát. Vhodná je i jako pícnina pro dobytek. Pyl lebedy rozkladité je výrazným alergenem.

Obrázek 6. Lebeda rozkladitá (*Atriplex patula* L.) (podle Híska, 2005)



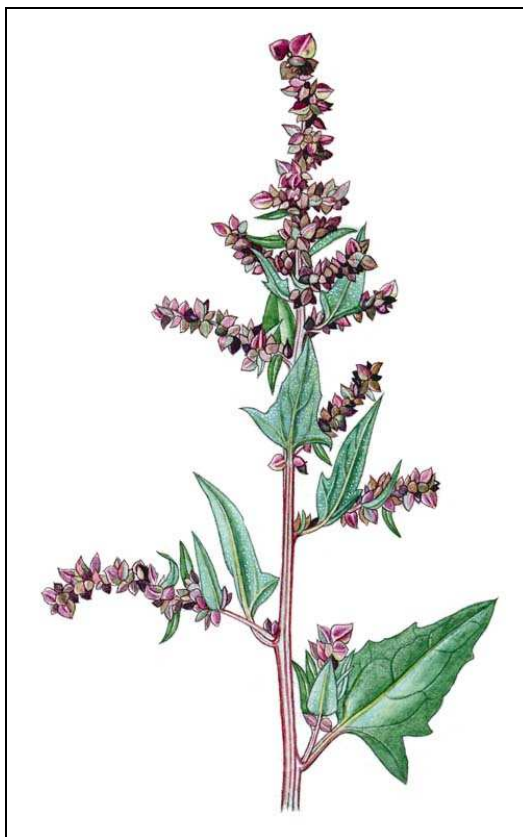
3.4 Lebeda hrálovitá

Atriplex prostrata DC.

3.4.1 Charakteristika druhu

Je to jednoletá rostlina vysoká 10-60 cm, přímá nebo poléhavá. Má hluboký, obvykle rozvětvený, křivý kořen (Hron a Kohout, 1988). Dolní větve lodyhy jsou vstřícné, horní střídavé. Listy jsou řapíkaté, na rubu pomoučené. Vyskytuje se na místech s vysokou koncentrací živin, zejména na slaniskách v aluviích, dále kolem hnojišť a cest. Je méně častá než ostatní druhy rodu *Atriplex*.

Obrázek 7. Lebeda hrálovitá (*Atriplex prostrata* DC.) (podle Híska, 2005)



3.5 Lebeda zahradní

Atriplex hortensis L.

3.5.1 Charakteristika druhu

Lebeda zahradní pochází nejspíše z JV části evropské části Ruska. Odtud se druhotně rozšířila na území mírného pásu Evropy, Asie, Ameriky a Austrálie. V české republice je pěstována jako zelenina, občas zplaňuje.

Je to mohutná, až 2 metry vysoká rostlina. Stonek je vzpřímený, listy jsou střídavé, oboustraně pomoučené. Květy jsou jednopohlavné, vzácně oboupohlavné.

3.5.2 Využití

V kuchyni může nahradit špenát. Vyrůstá sice záhy do květu, ale to neškodí sklizni listů, které i v tomto případě jsou jemné a dužnaté. Pro pěstování jako zelenina hodí se odrůdy s listem zeleným nebo žlutavým. Obsahuje méně kyseliny šťavelové než je tomu u špenátu.

3.6 Merlík bílý

Chenopodium album L.

3.6.1 Charakteristika druhu

Jde o jednoletý plevelný druh, který vyhledává stanoviště bohatá na dusík. Dorůstá výšky 20 až 150 cm. Listy a stonek merlíku bílého jsou modro- nebo šedozelené zbarvené, stonek bývá někdy načervenalý. Listy jsou mnohotvárné, vejčité kosočtverečné až kopinaté, špičaté, většinou zubaté. Bývají na obou stranách charakteristicky moučnatě poprášené. Merlík bílý má květenství lichoklas složený z klubíček, téměř bez listů. Květy jsou drobné, oboupohlavné, zřídka jednopohlavné, mají zřetelné, drobné pětičetné okvěti. Na jedné rostlině dozrává až 100 tisíc nažek, které mají nestejně dlouhou dormanci a nepravidelnou klíčivost. Šíří se osivem, statkovými hnojivy, kompostem aj. (Hron a Kohout, 1988).

Merlík bílý roste v České republice roztroušeně až hojně, celkově roste téměř na celém světě, převážně v mírných pásmech. Patří k nejrozšířenějším a nejnebezpečnějším plevelům polí i zahrad. Zapleveluje všechny plodiny, zvláště okopaniny a zeleninu. Patří k nejvýznamnějším ruderálním druhům – hojně roste na rumišťích, kompostech, polních hnojištích, pustých místech aj.

3.6.2 Využití

Merlík bílý patří mezi jedlé rostliny a jeho mladých listů lze používat na saláty, semena možno zkrmovat nebo semlít na mouku. Uvažuje se o jeho řízeném pěstování pro tvorbu biomasy na spalování. Jeho pyl je silný alergen a šíří se někdy až do příchodu mrazů.

Obrázek 8. Merlík bílý (*Chenopodium album* L.) (podle Híska, 2005)



3.7 Merlík zvrhlý

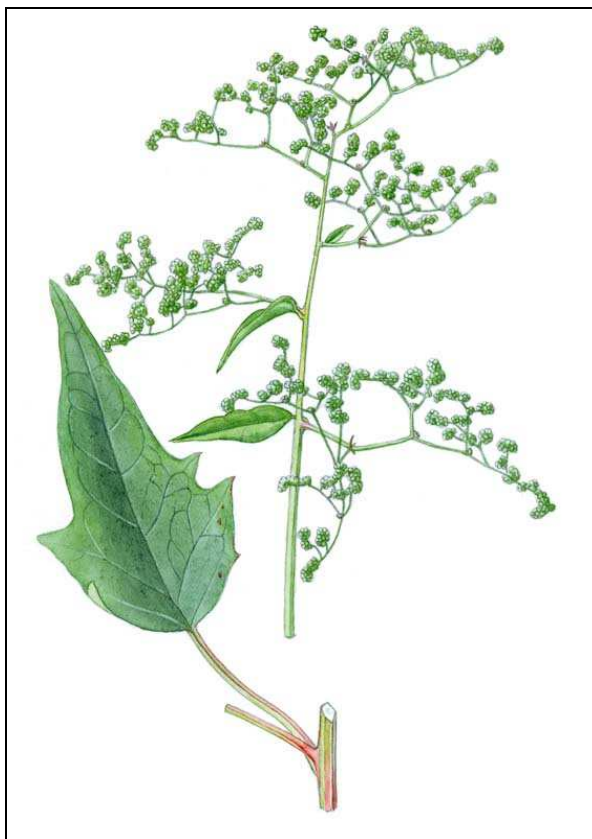
Chenopodium hybridum L.

3.7.1 Charakteristika druhu

Merlík zvrhlý je jednoletá bylina vysoká 40-100 cm s přímou lodyhou. Mladé rostlinky jsou slabě pomoučené, později vyrostou v lesklé byliny. Listy jsou řapíkaté, lesklé. Květenství je výrazně odlišné od ostatních běžných druhů merlíků – řídké, vidlanovité, obvykle široce rozkladité, umožňující již z dálky tento druh bezpečně určit. Květy jsou zelené, pětičetné, nenápadně kvetoucí, někdy pomoučené; plod je nažka. Na jedné rostlině dozrává až několik tisíc semen.

Roste na rumišťích, podle cest a jako plevel na zahradách a polích, vždy na holých kypřejších půdách bohatých na živiny. Na úrodných a zejména zavlažovaných půdách vytváří statné a silně větvené rostliny. Na našem území se jedná o archeofyt, roste především v teplejších oblastech státu. Je citlivý na nízké teploty a na podzim již při prvních mrazících odchází. Jedná se o méně významný plevelný druh.

Obrázek 9. Merlík zvrhlý (*Chenopodium hybridum* L.) (podle Híska, 2005)



3.8 Merlík mnohosemenný

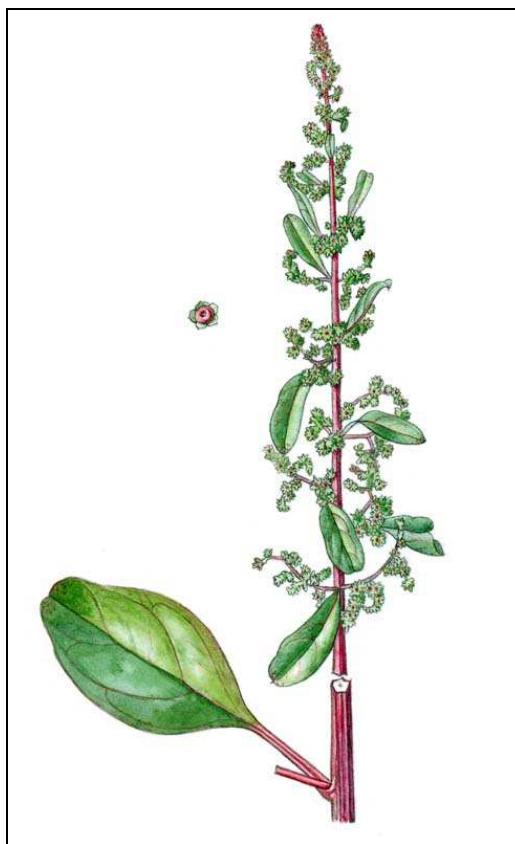
Chenopodium polyspermum L.

3.8.1 Charakteristika druhu

Jedná se o jednoletou poléhavou nebo vystoupavou rostlinu. Stonek je čtyřhranný, často načervenalý, listy jsou podlouhle vejčité s dlouhým řapíkem a celokrajné. Květenství je olistěné, semeno leskle černé. Kveté převážně od července do podzimu a na jedné rostlině dozrává několik desítek tisíc nažek (Hron a Kohout, 1988). Nažky si udržují v půdě klíčivost několik let. Šíří se komposty, půdou, statkovými hnojivy, osivem aj.

Merlík mnohosemenný se vyskytuje v mírném a submeridionálním pásmu Evropy, Středozeří a Asie na východ po Altaj, zavlečen v jižní Africe a Severní Americe. U nás je archeofytem, hojně je rozšířený po celém území státu, v horských polohách však zřídka. Roste na polích, zahradách, kolem cest a silnic, na kompostech, rumištích, březích vod a rybníků. Patří k prvním osidlovačům nových půd, hald apod.

Obrázek 10. Merlík mnohosemenný (*Chenopodium polyspermum* L.) (podle Híska, 2005)



3.9 Špenát setý

Spinacia oleracea L.

3.9.1 Charakteristika druhu

Špenát je jednoletá, až 1 m vysoká bylina, zplanělé formy jsou dvouleté. Květy jsou uspořádány v hustých lichoklasech, plodem je nažka. Nažky jsou obaleny tvrdým čtyřčetným okvětím. Plod má často na různých místech různé výběžky. Listy jsou široce oválné, resp. vejčité, na konci tupě špičaté, řapíky jsou dlouhé asi poloviny čepele nebo delší.

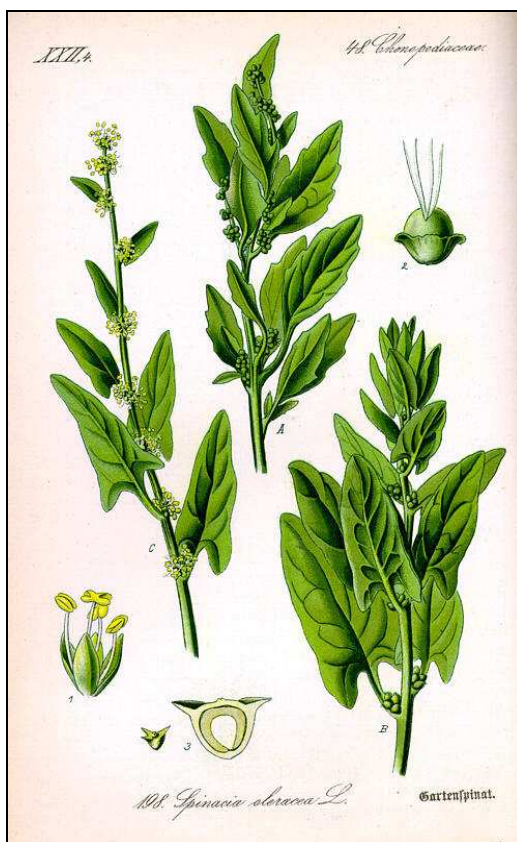
Jedná se o důležitou listovou zeleninu. Kultivována byla v jihozápadní Asii, patrně v Persii. Odtud se špenát nejprve dostal do severní Afriky, kolem roku 1100 byl přivezen do Španělska a dále se pak šíří do celé Evropy. První recepty, ve kterých se používá špenát, jsou dochovány v kuchařské knize z roku 1390. Navzdory všeobecnému mínění není špenát zvlášť bohatý na železo, ale i tak obsahuje cenné živiny.

3.9.2 Využití

U všech odrůd špenátu se konzumují listy. Jsou velmi snadno stravitelné a výživné. Špenát je bohatý na hořčík, sodík, železo, jód a křemík. Obsahuje hemolyticky účinný saponin. Podle některých výzkumů je působí špenát jako prevence rakoviny. Ve špenátu jsou obsaženy karotenoidy (i beta-karotenu), a to ve vysokých koncentracích. Obsahuje také lutein, karotenový pigment, který působí antioxidantně. Výzkumy prokázaly, že častější konzumace potravy bohaté na beta-karoten pomáhá předejít degenerace žluté skvrny oční sítnice, která často způsobuje slepotu u starších lidí. Špenát se odedávna doporučoval na vysoký krevní tlak (obsahuje hodně draslíku, který reguluje krevní tlak), anémii a také zácpu.

Nevýhodou je jeho sklon kumulovat dusičnany. Obsahuje také vysoké množství kyseliny šťavelové. Konzumace vařeného špenátu tak může být spojena s rizikem tvorby ledvinových kamenů.

Obrázek 11. Špenát (*Spinacia oleracea* L.)



4. Analytické metody

4.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Chromatografie je separační metoda, která je založena na rozdílné afinitě složek směsi vzorku k mobilní a stacionární fázi. Pomocí této metody je možné identifikovat a stanovit velké množství rozličných organických i anorganických látek. Fáze procházející kolonou se označuje jako mobilní (plyn nebo kapalina), fáze nepohyblivá jako stacionární nebo také jinak sorbent. Ten může být tvořen drobnými částicemi tuhé fáze o velikosti jednotek až stovek mikrometrů nebo kapalinou potahující povrch inertního nosiče či film kapaliny na vnitřní stěně kapiláry. Mobilní fáze prochází kolonou, která je naplněna sorbentem, a unáší vzorek. Dochází k vzájemným interakcím mezi stacionární fází, mobilní fází a dělenými látkami vzorku, tyto interakce mají rozhodující vliv na průběh separačního procesu.

Pokud je mobilní fází plyn, hovoříme o plynové chromatografii (GC, gas chromatography). Je-li mobilní fází kapalina, jedná se o kapalinovou chromatografii, nazývanou také jako LC, HPLC, liquid chromatography nebo rozdělovací chromatografie.

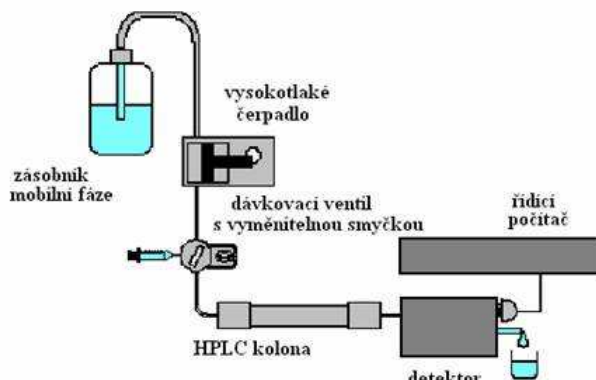
Kapalinová chromatografie zahrnuje všechny chromatografické způsoby separace, kdy je mobilní fáze kapalná. S ohledem na experimentální uspořádání hovoříme o kapalinové chromatografii v otevřeném systému (papírová a tenkovrstvá chromatografie) a v uzavřeném systému (dnes zejména vysokoúčinná kapalinová chromatografie HPLC).

HPLC je pro stanovení flavonoidů nejčastěji využívanou metodou (Hertog et al., 1992a, Hertog et al., 1992b, Hollman et al., 1996, Carnat et al., 1998, Tomlinson et al., 2003, Papp et al., 2004, Correia et al., 2006).

Mobilní fáze při isokratické eluci je vedena ze zásobníku přes odplyňovač do vysokotlakého čerpadla. Při gradientové eluci jsou jednotlivé části mobilní fáze nejprve přivedeny do směšovače, kde se mísí ve zvoleném poměru a teprve pak se dostávají do čerpadla. Zcela převažujícím způsobem nástřiku vzorku je použití tzv. šesticestného kohoutu s dávkovací smyčkou. Smyčka o konstantním objemu se naplní vzorkem, poté se přepne do druhé polohy, která umožňuje protékání eluentu nebo mobilní fáze. Eluent protéká smyčkou a vnáší vzorek do kolony. Nejčastěji se používají kolony o délce 10 až 100 cm s vnitřním průměrem od 0,2 do 2 cm. Velikost zrn sorbentu se pohybuje mezi 3 –

50 μm . Při analýze přírodních látek se doporučuje využívat ochranné předkolony. Zabrání se tak zničení vlastní kolony zachycením balastních látek.

Obrázek 12. Schéma HPLC sestavy



Pro detekci je velmi rozšířen průtokový fotometrický či fluorimetrický detektor. Eluát protéká měrnou celou malého objemu s velkou optickou délkou (obvykle $V = 5$ až $10 \mu\text{m}$, $l = 10 \text{ mm}$). Při vhodně volené vlnové délce je registrována absorbance eluátu. Moderní přístroje jsou vybaveny detektory s proměnlivou a programově měnitelnou vlnovou délkou či tzv. diode array detektorem, schopným proměřit ve zvoleném okamžiku celé UV/VIS spektrum složky. Získaná informace je důležitým kvalitativním údajem o sledované složce (Drbal a Křížek, 1999).

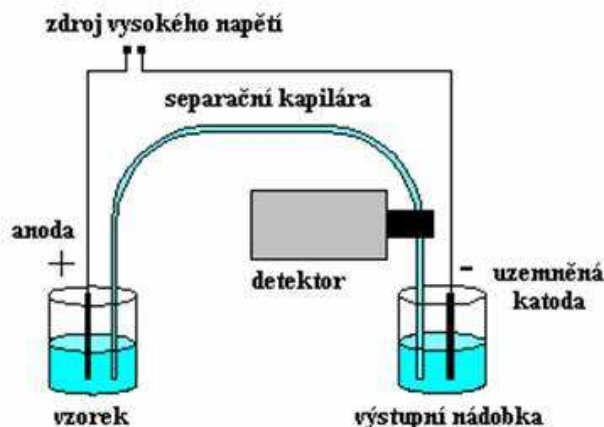
4.2 Kapilární elektroforéza (CE)

Principem celého děje je separace vlivem elektrického pole, která se uskutečňuje v křemenné kapiláře. Na obou svých koncích je kapilára ponořena do elektrodových nádobek, ke kterým jsou připojeny elektrody vysokonapětového zdroje vytvářející elektrické pole. Celý systém je uzavřen ve schránce, aby nedocházelo k odparu roztoku elektrolytu z porézního média. Kationty i anionty se dají do pohybu opačnými směry různou rychlostí a rozdělí se na více či méně oddělené skvrny či zóny. Na distálním konci kapiláry je umístěn detektor, který snímá analytický signál. Analytický signál je zapsán liniovým zapisovačem nebo dále zpracován počítačem (Dolník, 1994).

Délka kapiláry se pohybuje od 15 cm do 100 cm. Poblíž katodového konce kapiláry je odstraněn její vnější polyimidový povrch v délce několika milimetrů. Tím vzniká na kapiláře okénko, kterým příčně prochází ultrafialové či viditelné záření ze zdroje kapilárou

do detektoru. Fotometrická detekce je v KZE jako v HPLC nejobvyklejší (Drbal a Křížek, 1999).

Obrázek 13. Schéma aparatury pro kapilární zónovou elektroforézu



Kapilární elektroforéza je používána pro analýzu flavonoidů v menší míře než kapalinová chromatografie, což souvisí s obecně menším rozšířením této analytické metody. Jejimi přednostmi je krátká doba analýzy, obecně malá spotřeba pufrů a rozpouštědel a vysoká rozlišovací schopnost. Kapilární elektroforéza je často používána pro analýzu flavonoidů v extraktech z léčivých rostlin (Pietta et al., 1991) a byla také vypracována metoda pro analýzu rutinu v pohance (Kreft et al., 1991). Kapilární elektroforéza byla také použita pro analýzu fenolických látek v červeném víně (Gil et al., 1995).

První separace flavonoidů na kapilární elektroforéze byla provedena v roce 1991 Piettem a kol., kteří ji použili pro rozdělení a identifikaci flavonoidních glukosidů. Tato metoda je pro stanovení flavonoidů méně využívána, běžnější je kombinace CE a HPLC.

4.2.1 Varianty kapilární elektroforézy

V podstatě rozlišujeme čtyři varianty kapilární elektroforézy, jedná se o zónovou elektroforézu, izotachoforézu, micelární elektrokinetickou chromatografii a izoelektrickou fokusaci. Separační principy jsou u jednotlivých variant dost odlišné: zatímco v zónové elektroforéze a izotachoforéze dochází separaci na základě rozdílů efektivních pohyblivostí a v elektrokinetické micelární chromatografii na základě rozdílů rozdělovacích koeficientů

mezi mobilní a pseudostacionární fází, jsou v izoelektrické fokusaci separandy od sebe děleny na základě rozdílů v izoelektrických bodech.

4.2.2 Kapilární zónová elektroforéza

Při kapilární zónové elektroforéze jsou rezervoáry s tlumivým roztokem propojeny kapilárou vyplněnou rovněž tlumivým roztokem. Pro tuto metodu je charakteristické použití jednoho pracovního elektrolytu v celém separačním systému. V důsledku toho je v celé separační kapiláře konstantní elektrické pole. Jednotlivé zóny putují stále stejnou rychlostí, takže se v průběhu separace od sebe stále více vzdalují. Vlivem difúze se zónová rozhraní s časem rozmývají (Dolník, 1994).

Uzavřená tenká kapilára uděluje kapilární zónové elektroforéze v tomto provedení kvalitativně zcela nové vlastnosti. Výhodou je možnost zvyšovat svorkové napětí přístroje až k hodnotám 30 kV, vzniklé teplo při takovýchto hodnotách je odvedeno stěnou kapiláry do okolního termostatovaného prostoru. U běžné elektroforézy by při takovýchto hodnotách napětí došlo k značnému ohřevu tlumivého roztoku. Následné zvýšení difúze a turbulence v roztoku by analýzy zcela znehodnotilo.

Další významnou vlastností křemenných kapilár je existence elektroosmotického toku kapaliny (pufru) kapilárou. Vnitřní kapilární povrch se chová jako slabě kyselý katex. Při pH větším než 2 dochází s růstem pH k stále významnějšímu nahrazování H^+ iontů na vnitřním kapilárním povrchu za jiné (nejčastěji Na^+) ionty, které jsou běžnou složkou tlumivého roztoku. Kationty migrují ke katodě a vzhledem ke své hydrataci strhávají s sebou roztok v kapiláře. Proudění kapaliny kapilárou vyvolanému tímto jevem říkáme elektroosmotický tok. Tento tok je při pH 2 téměř nulový, s vzrůstem pH se zvyšuje.

Rychlost elektroosmotického toku je ve srovnání s rychlostí běžných iontů dominantní. Protože výsledná rychlost pohybu aniontů a kationtů je dána vektorovým součtem jejich migrační rychlosti v a rychlosti pohybu elektroosmotického toku, jsou kationty i anionty během analýzy unášeny ke katodě.

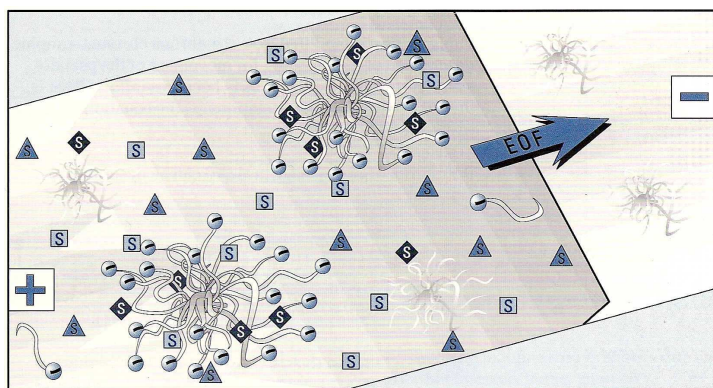
Dávkované množství je přibližně 1000 x nižší než u chromatografických metod. Při napětí 10 – 30 kV dochází v kapiláře k elektroosmotickému toku, kterým jsou jak kationty, tak anionty unášeny k detektoru. Během této cesty probíhá vzájemná separace (Drbal a Křížek, 1999).

4.2.3 Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MECC)

Tato technika se s oblibou využívá pro separaci elektroneutrálních látek. Podmínkou je přidání povrchově-aktivní látky (tenzidu) do tlumivého roztoku v tzv. nadkritické koncentraci. Velmi často se používá dodecylsulfát sodný. Vlivem tenzidu dochází v roztoku ke tvorbě micel. Hydrofóbní části molekuly tenzidu jsou orientovány dovnitř micely, hydrofilní část naopak ven do roztoku. Nenabitě organické látky mohou interagovat s micelami podobně jako v kapalinové chromatografii interagují se stacionární fází. Zejména polarita látky rozhodne, jak dlouho se bude příslušná složka vzorku v hydrofobním jádře micely zdržovat.

V situaci, kdy látka není vázaná uvnitř micely, je unášena elektroosmotickým tokem. Separace látek probíhá tedy na základě nestejně četnosti a míře interakcí dělených elektroneutrálních látek se systémem micel v tlumivém roztoku. Pro svou podobnost s chromatografickými technikami je systém micel v tlumivém roztoku nazýván jako pseudostacionární fáze (Drbal a Křížek, 1999).

Obrázek 14. Separace na MECC



EOF = elektroosmotický tok

S = látka rozpuštěná v roztoku (solut)

IV. CÍLE PRÁCE

Z provedené literární rešerše vyplynulo, že pestrá strava je bohatá na fenolické látky flavonoidy. Mezi mnohými sloučeninami vynikají svým biologickým účinkem flavonoly s hlavním zástupcem kvercetinem a jeho derivátem rutinem. Obě tyto sloučeniny mají výrazné antioxidační účinky a mohou tedy působit jako zdroj ochrany před kardiovaskulárními onemocněními.

Merlíky (*Chenopodium* L.) a lebedy (*Atriplex* L.) jsou zajímavými rostlinnými druhy z hlediska jejich potravinového využití. Přestože se jedná o plevelné druhy, byly tyto rostliny v minulosti využívány jako zdroj potravy.

Pro stanovení obsahu kvercetinu a rutinu byla jako vhodná analytická metoda zvolena kapilární elektroforéza. Zastoupení různých fenolických látek bylo zjištěno metodou vysoceúčinná kapalinová chromatografie.

Řešení bylo zaměřeno na následující cíle:

- stanovit obsah celkového kvercetinu v konkrétních druzích,
- stanovit obsah rutinu v konkrétních druzích,
- zjistit zastoupení různých fenolických látek v konkrétních druzích.

V. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Pro účely vypracování diplomové práce byly použity dvě nezávislé analytické metody. Metoda HPLC byla použita pro kvalitativní stanovení fenolických látek ve vzorcích rostlin a metoda MECC sloužila ke kvantitativnímu stanovení celkového kvercetinu a rutinu.

Analýzám byly podrobeny tři druhy rodu merlík a tři druhy rodu lebeda. Všechny tyto rostlinné druhy patří mezi volně rostoucí a v České republice běžné druhy. Pro srovnání byly vybrány dva příbuzné druhy kulturních rostlin, které se používají jako listová zelenina, a to špenát setý (odrůda Matador, z maloobchodní sítě) a lebeda zahradní (odrůda neznámá, od soukromého pěstitele).

Tabulka 3. Odebrané vzorky

špenát setý	<i>Spinacia oleracea</i> L.
lebeda zahradní	<i>Atriplex hortensis</i> L.
lebeda lesklá	<i>Atriplex sagittata</i> BORKH.
lebeda hrálovitá	<i>Atriplex prostrata</i> DC.
lebeda rozkladitá	<i>Atriplex patula</i> L.
merlík bílý	<i>Chenopodium album</i> L.
merlík mnohosemenný	<i>Chenopodium polyspermum</i> L.
merlík zvrhlý	<i>Chenopodium hybridum</i> L.

1. Odběr rostlinného materiálu

Z vybraných druhů byly k analýze vybrány listy a květenství. Tyto části byly odebírány z volně rostoucích rostlin na jejich typických stanovištích. Odběr byl proveden v červnu a červenci roku 2008 v okolí města České Budějovice. Druhové určení bylo potvrzeno přímo na stanovišti podle literatury (Kubát et al., 2002). Rostlinný materiál byl odebírán u každého druhu minimálně z pěti exemplářů, aby byl zajištěn dostatečně velký průměrný vzorek. U každého druhu bylo odebráno minimálně 50 g rostlinného materiálu.

Materiál byl odebírán v dopoledních hodinách slunečného dne beze srážek, vždy po vymizení ranní rosy.

2. Úprava rostlinného materiálu

Odebraný materiál byl bezprostředně (do dvou hodin) po odběru v terénu zpracován v laboratoři. Části rostlin byly podle potřeby povrchově očištěny, zváženy a zamrazeny v polyethylenových sáčcích při teplotě $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zmrazený materiál byl lyofilizován do jednoho měsíce od odběru při teplotě $-46\text{ }^{\circ}\text{C}$ a tlaku $0,025\text{ kPa}$ po dobu 24 hodin. Vysušený materiál byl zhomogenizován na laboratorním mlýnku a do analýzy skladován v plastové vzorkovnici při teplotě $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$. Podle literatury (Hertog et al., 1992a) je takto upravený vzorek minimálně 1 rok stabilní.

3. Použité chemikálie a standardy

Všechny použité chemikálie byly čistoty p.a., pokud není uvedeno jinak. Pro všechny práce byla používána demineralizovaná voda, která byla připravena na zařízení firmy Premier (USA).

tetraboritan sodný (borax) (Sigma Chemicals, USA)

laurylsíran sodný (Sigma Chemicals, USA)

kyselina boritá (Lachema, ČR)

kyselina chlorovodíková (Lachema, ČR)

hydroxid sodný (Lachema, ČR)

hydrogenuhličitan sodný (Lachema, ČR)

kyselina 1-naftyloctová (Lachema, ČR)

kyselina L-askorbová (Merck, Německo)

kvercetin (Aldrich Chemie, Německo)

rutin (Sigma Chemicals, USA)

methanol (Penta Chrudim, ČR)

acetonitril (LiChrosolo Merck, Německo)

kyselina o-fosforečná (Aldrich Chemie, Německo)

4. Laboratorní sklo a přístroje

sada laboratorního skla (Fisher Scientific, Pardubice, ČR)

analytické váhy AB 204 (Mettler Toledo, Švýcarsko)

technické váhy Kern (Německo)
lyofilizátor Alpha 1-2 (Christ, Německo)
kombinovaná lednička s chladničkou (Bosch Cooler, Německo)
teplovzdušná sušárna ULM (Memmert, Německo)
SPE izolační jednotka (vývojové dílny JU, ČR)
kapilární elektroforéza SpectraPhoresis 2000 (Thermo Separation Product, USA)
vodní lázeň termostatovaná míchaná EL-20 R (Kavalier, ČR)
pipety automatické, objem 20-200 μ l a 100-1000 μ l Transferpette (Treff AG, Švýcarsko)
digitální pipeta FinnpiPETTE Biocontrol (Thermo LabSystem, Finsko)
dávkovač kapalin 5 ml (Sklo Union, ČR)
odstředivka Sigma 2-5 (Sigma Laborzentrifugen, Německo)
pH-metr Inolab-1, s elektrodou SenTix 61 (WTW, Německo)
SPE kolonky RP-18, RP-18E, CN, SI, NH₂ (Merck, Německo)
SPE kolonky Strata-X (Phenomenex Inc., USA)
ultazvuková lázeň Sonorex RK 31 (Německo)
filtrační papír Filtrak (Filtrak GmbH, Německo)
filtry ze skleněných vláken GF/C (Whatman, Velká Británie)
centrifuga (Hettich Universal 32 R, Německo)
kapalinový chromatograf (Hewlett Packard T-1050, USA)
kolona: Phenomenex Luna C18(2), 3 μ m, 2 x 150 mm
detektor Agilent 1100 DAD - G1315B

5. Příprava roztoků pro MECC

Roztok pracovního borátového pufru se skládal z 10 mM boraxu, 10 mM kyseliny borité a 15 % methanolu (v/v). Pracovní borátový pufr s laurylsíranem sodným (SDS) obsahoval 10 mM boraxu, 10 mM kyseliny borité, 20 mM SDS a 15 % methanolu (v/v).

Zásobní roztoky standardu kvercetinu o koncentraci 1 mg/ml a vnitřního standardu kyseliny 1-naftyloctové o koncentraci 2 mg/ml byly připravovány ve 100 % methanolu. Tyto roztoky byly skladovány v temnu při teplotě 4 °C a používány pro ředění standardních roztoků dle potřeby.

K promývání kapiláry byly připravovány 0,1 M roztok kyseliny chlorovodíkové a 1 M a 0,1 M roztoky hydroxidu sodného.

Jako ředící roztok byl používán 5 % methanol (v/v) ve vodě. Hodnota pH byla upravena na 3,5 pomocí 1 M HCl.

6. Metodika stanovení pro MECC

Pro zpracování diplomové práce byla využita analytická metoda vyvinutá na pracovišti zemědělské fakulty Jihočeské univerzity, na katedře aplikované chemie. Metodika stanovení obsahu flavonoidu kvercetin a rutinu vychází z publikované práce (Dadáková et al., 2001) a navazuje na původní práce vyvinuté pro stanovení vybraných flavonoidů metodou HPLC (Hertog et al., 1992a).

Použitá metoda však oproti původní metodě obsahuje odlišnou analytickou koncovku. Pro účely kapilární elektroforézy je nutné vzorek zbavit balastních látek a maximálně zakoncentrovat. Analýza se skládá z kyselé hydrolýzy veškerých glykosidů přítomných ve vzorku. Dále následuje úprava vzorku odstředěním, filtrací a ředěním. Sorpce analytu se provádí na kolonkách SPE a analytickou koncovkou je metoda micelární elektrokinetické kapilární elektroforézy (MECC).

6.1 Stanovení celkového kvercetin metodou MECC

Flavonol kvercetin představuje nejběžnější druh flavonoidního aglykonu. V rostlinném materiálu je vždy vázán v glykosidické formě na molekulu některého sacharidu. Volný kvercetin se vyskytuje velmi zřídka a bývá uvolněn z glykosidické formy nejčastěji enzymovou aktivitou přítomných mikroorganismů. Každý rostlinný materiál obsahuje více druhů glykosidů a stanovit obsah jednotlivých látek by bylo analyticky obtížné. Jedním z důvodů je to, že nejsou k dispozici potřebné standardy. Je proto výhodnější kvercetin uvolnit ze všech glykosidických forem a stanovit sumu celkového kvercetin. Tato hodnota pak podá představu o obsahu kvercetinových glykosidů v materiálu.

Navážka asi 0,25 g lyofilizovaného homogenizovaného materiálu, váženého na analytických vahách s přesností na 0,1 mg byla vložena do 100 ml varné baňky. Dále

bylo přidáno 80 mg kyseliny askorbové, 12,5 ml methanolu, 7,5 ml vody a 5 ml 6 mol.l⁻¹ HCl. Tato směs byla zahřívána 2 hodiny pod zpětným chladičem v termostatované vodní lázni při teplotě 85°C. Hydrolyzovaný vzorek byl po vychlazení neutralizován 2 g NaHCO₃, převeden kvantitativně do odstředivací kyvety a odstředěn (15 minut, 3500 otáček za minutu). Sediment byl resuspendován pomocí 7,5 ml methanolu a vody a odstředěn za stejných podmínek. Postup odstředování byl opakován ještě jednou, odstředování vzorku probíhalo tedy celkem třikrát. Spojené supernatanty byly shromažďovány v 600 ml kádince, doplněny na objem 200 ml vodou a kyselost roztoku byla upravena na hodnotu pH 3 nasyceným roztokem NaHCO₃. Roztok byl přefiltrován za sníženého tlaku přes filtr ze skleněných vláken GF/C (Whatman, Velká Británie), filtr byl dále promyt za normálního tlaku 5 ml methanolu. Filtrát byl poté kvantitativně převeden do 500 ml odměrné baňky a doplněn vodou po rysku. Tento roztok byl použit pro SPE na kolonkách, ředěn nejčastěji v poměru 1:2. Zachycené látky byly eluovány pomocí 1,4 ml methanolu do měrné vialky. Do vialky byl přidán 0,1 ml roztoku vnitřního standardu kyseliny 1-naftyloctové v methanolu o koncentraci 2 mg/ml.

6.2 Stanovení rutinu metodou MECC

Rutin (kvercetin-3-O-D-rutinosid) je nejběžnějším kvercetinovým glykosidem a vyskytuje se v mnoha rostlinných druzích. Při jeho stanovení postačí extrakce z rostlinného materiálu pomocí organického rozpouštědla.

Navážka asi 0,25 g lyofilizovaného homogenizovaného materiálu, váženého na analytických vahách s přesností na 0,1 mg, byla vložena do 100 ml varné baňky s 80 mg kyseliny askorbové, 12,5 ml methanolu a 12,5 ml vody. Tato směs byla zahřívána 1 hodinu pod zpětným chladičem v termostatované vodní lázni při teplotě 90°C. Extrahovaný vzorek byl po vychlazení kvantitativně převeden do odstředivací kyvety a odstředěn (15 minut, 3500 otáček za minutu). Sediment byl resuspendován pomocí 7,5 ml methanolu a vody a odstředěn za stejných podmínek. Postup odstředování byl opakován ještě jednou, odstředování vzorku probíhalo tedy celkem třikrát. Spojené supernatanty byly shromažďovány v 600 ml kádince, doplněny na objem 200 ml vodou a kyselost roztoku byla upravena na hodnotu pH 3 pomocí roztoku HCl o koncentraci 1 mol.l⁻¹.

Roztok byl přefiltrován za sníženého tlaku přes filtr ze skleněných vláken GF/C (Whatman, Velká Británie), filtr byl dále promyt za normálního tlaku 5 ml methanolu. Filtrát byl poté kvantitativně převeden do 500 ml odměrné baňky a doplněn vodou po rysku. Tento roztok byl použit pro SPE na kolonkách. Zachycené látky byly eluovány pomocí 1,4 ml methanolu do měrné vialky. Do vialky byl přidán 0,1 ml roztoku vnitřního standardu kyseliny 1-naftyloctové v methanolu o koncentraci 2 mg/ml.

6.3 Měření na kapilární elektroforéze

Připravené roztoky byly měřeny na kapilární elektroforéze s použitím borátového pracovního pufru o složení 10 mM tetraboritanu sodného, 10 mM kyseliny borité, 20 mM SDS a 15 % (v/v) methanolu, pH = 9,2. Doba analýzy vzorku byla 25 minut. Pracovní napětí přístroje bylo 15 kV a pracovní teplota 25 °C. Analyt (rutin nebo kvercetin) se odečítal při 270 nm. Mez stanovitelnosti byla 10 mg/kg pro rutin i kvercetin.

7. Metodika stanovení fenolických látek metodou HPLC

Pro přípravu extraktu z lyofilizovaných rostlin bylo použito 0,250 g rozemletého homogenizovaného materiálu. Vzorek byl extrahován pomocí 3 ml 70 % methanolu po dobu 45 minut při laboratorní teplotě za stálého protřepávání a chráněn před světlem. Po následné centrifugaci (3500 otáček za minutu, po dobu 10 minut, teplota 20°C) byl odebrán supernatant a sediment byl resuspendován ještě dvakrát v 1 ml 70 % methanolu. Poté byly všechny supernatanty spojeny a byl odečten objem extraktu.

Všechny extrakty byly měřeny na kapalinovém chromatografu s připojením na DAD detektor. K analýze byla použita kolona Phenomenex Luna C 18 (2), 3 µm, 2 x 150 mm.

Mobilní fáze se skládala z acetonitrilu, vody a kyseliny fosforečné. Jednotlivé složky byly smíchány v 2 typy roztoků:

A: 5 % acetonitril a 0,1 % kyseliny o-fosforečné

B: 80 % acetonitril a 0,1 % kyseliny o-fosforečné

Byl použit gradient od 0 % B do 53 % B po dobu 55 minut při průtoku 0,25 ml/min a pracovní teplotě 25°C. Objem nástřiku vzorku byl 5 µl. Během analýzy bylo měřeno spektrum všech látek v rozsahu 190 až 600 nm, detekce látek probíhala při 220 nm. Sledované fenolické látky byly identifikovány srovnáním retenčního času a naměřeného spektra se standardem.

VI. DISKUSE

Pro získání experimentálních dat o obsahu fenolických látek v rostlinách podčeledi *Chenopodoideae* Burnett byly použity dvě nezávislé analytické metody a to metoda micelární elektrokinetické kapilární chromatografie (MECC) a metoda kapalinové chromatografie (HPLC). Stanovení fenolických látek bylo obtížné, protože rostlinné materiály obsahují směsi těchto látek a chybí standardy ke kvantifikaci. Analýzou HPLC byly stanovené fenolické látky zařazeny do skupin a pomocí MECC byly určeny hodnoty celkového kvercetinu a rutinu v rostlinných vzorcích.

1. Stanovení fenolických látek metodou HPLC

Zastoupení fenolických látek v rostlinách podčeledi *Chenopodoideae* Burnett - merlíkovité bylo zjištěno pomocí metody HPLC s připojením k DAD detektoru. Fenolické látky byly identifikovány srovnáním retenčního času neznámé látky a standardu a pomocí naměřeného spektra se spektrem standardu.

Chromatografické profily analyzovaných rostlin ukazují bohaté zastoupení fenolických látek. Jednotlivé záznamy chromatografické analýzy jsou seřazeny podle druhu a části rostliny. Následující tabulka udává přehled identifikovaných fenolických látek a číselné označení jejich píků na chromatogramu (Tabulka 4).

Jak je vidět, pouze některé sloučeniny byly určeny přesně. Jsou to ty, pro které byly k dispozici příslušné analytické standardy. Byly to rutin, kvercetin, kyselina vanillová a epikatechin. Ostatní látky byly zařazeny do skupin podle typu jejich spektra. Látky, jejichž spektrum odpovídalo spektru flavonolu, jsou patrně glykosidy kvercetinu nebo některého dalšího flavonolu (kemferolu nebo myricetinu).

Tabulka 4. Fenolické látky identifikované metodou HPLC

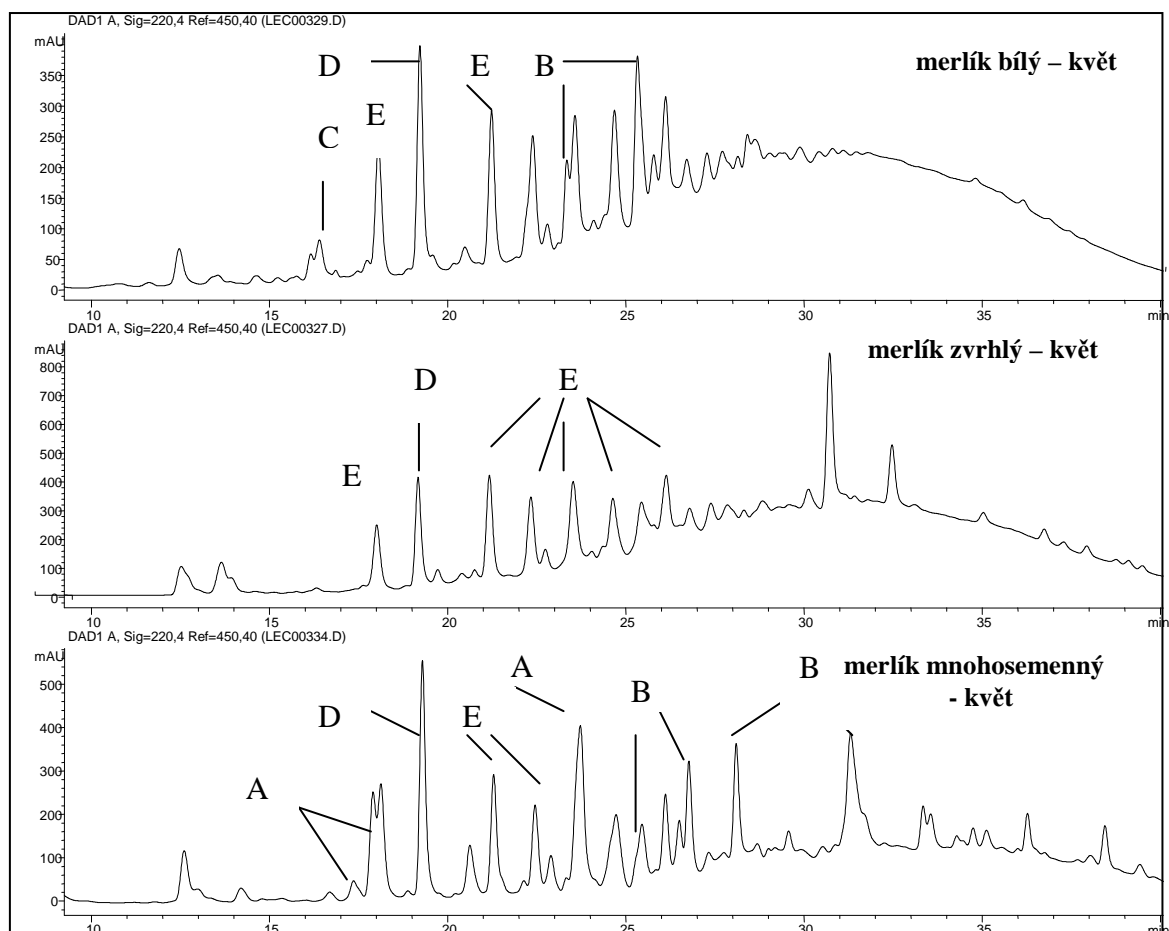
označení píku	fenolická sloučenina
A	látky s UV spektrem podobným kávové kyselině
B	látky se stejným spektrem, odpovídajícím flavonolu
C	vanillová kyselina
D	epikatechin
E	neurčené látky se stejným spektrem

1.1 Analýza fenolických sloučenin v květenstvích rodu *Chenopodium*

V květenstvích všech zkoumaných rostlin rodu *Chenopodium* byl zjištěn epikatechin (pík D). Další podobnost složení látek v květenstvích naznačuje větší množství píků (E) označují přítomnost neurčených látek se stejným spektrem.

Chromatogram merlíku bílého navíc obsahuje látky se stejným spektrem, odpovídajícím flavonolu (pík B). Tyto látky jsou přítomné také při analýze merlíku mnohosemenného, u merlíku zvrhlého pík odpovídající flavonolu nebyl zaznamenán. Totéž platí i pro látky s UV spektrem podobným kávové kyselině (pík A), které byly nalezeny u merlíku bílého i mnohosemenného, u merlíku zvrhlého nebyly zaznamenány. Merlík bílý a merlík zvrhlý dále společně obsahovali vanillovou kyselinu (pík C).

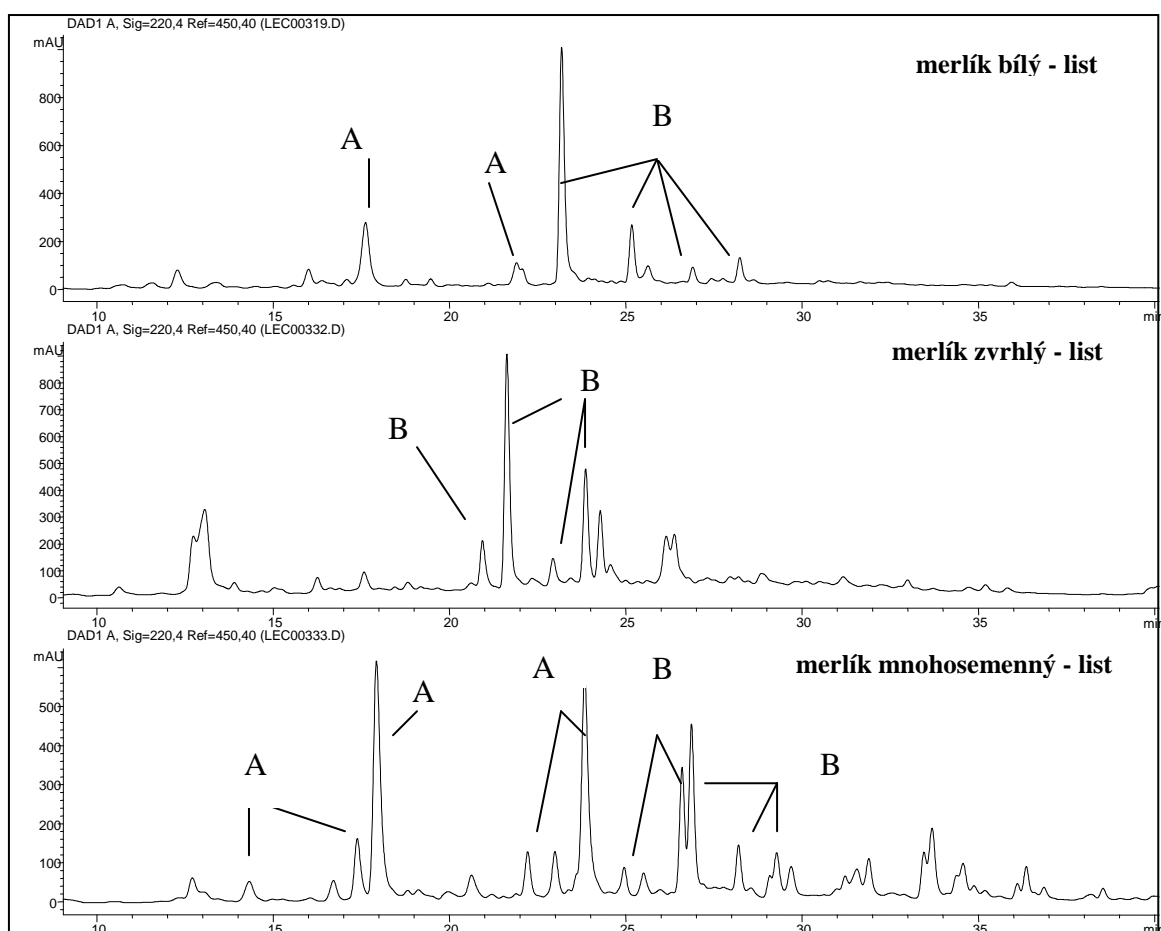
Obrázek 15. Záznam z analýzy HPLC – květenství merlíky



1.2 Analýza fenolických sloučenin v listech rodu *Chenopodium*

Chromatogramy listů všech zkoumaných rostlin rodu *Chenopodium* obsahují látky se stejným spektrem, odpovídajícím flavonolu (pík B). Merlík bílý a merlík mnohosemenný shodně obsahují látky s UV spektrem podobným kávové kyselině (pík A), u merlíku zvrhlého tyto látky nebyly zaznamenány.

Obrázek 16. Záznam z analýzy HPLC – list merlíky

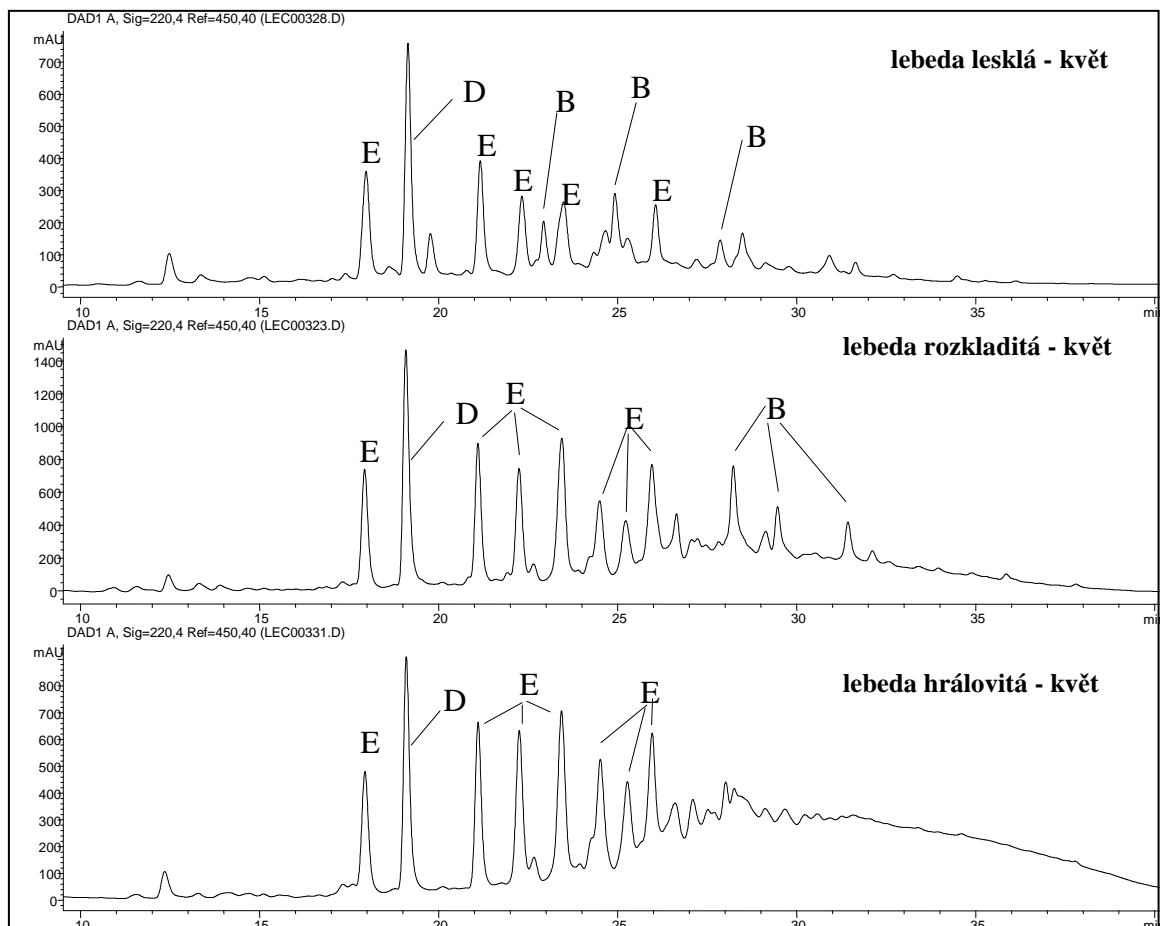


1.3 Analýza fenolických sloučenin v květenstvích rodu *Atriplex*

V květenstvích všech zkoumaných rostlin rodu *Atriplex* byl zjištěn epikatechin (pík D). Ve všech třech zkoumaných druzích lebed bylo také zaznamenáno větší množství pík (E) označujících přítomnost neurčených látek se stejným spektrem. Všechna květenství rodu

Atriplex a rodu *Chenopodium* jsou si v analýze fenolických látek pomocí HPLC dosti podobná, obsahují stejné píky D a E označující dané látky.

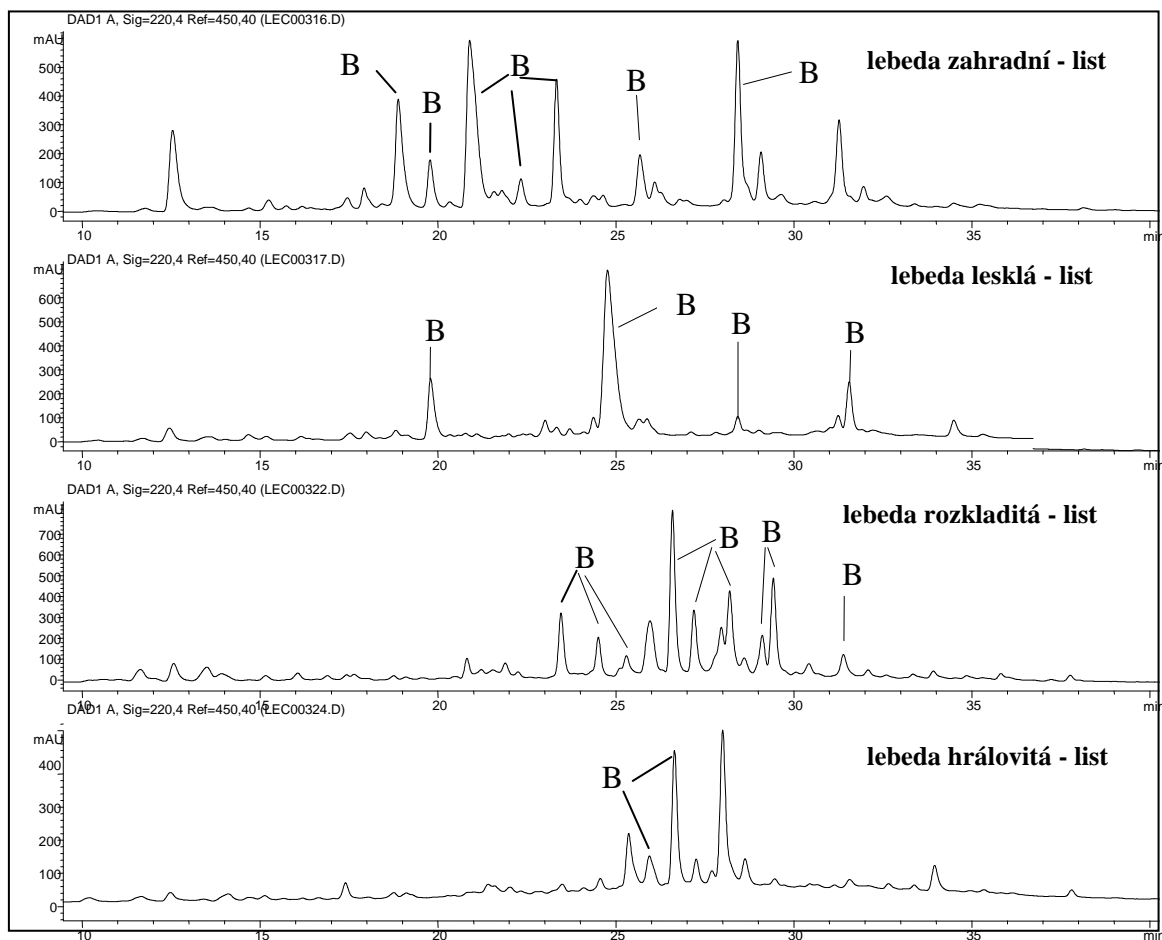
Obrázek 17. Záznam z analýzy HPLC – květenství lebedy



1.4 Analýza fenolických sloučenin v listech rodu *Atriplex*

V listech zkoumaných rostlin rodu *Atriplex* byla analýzou potvrzena přítomnost látek se stejným spektrem, odpovídajícím flavonolu (pík B).

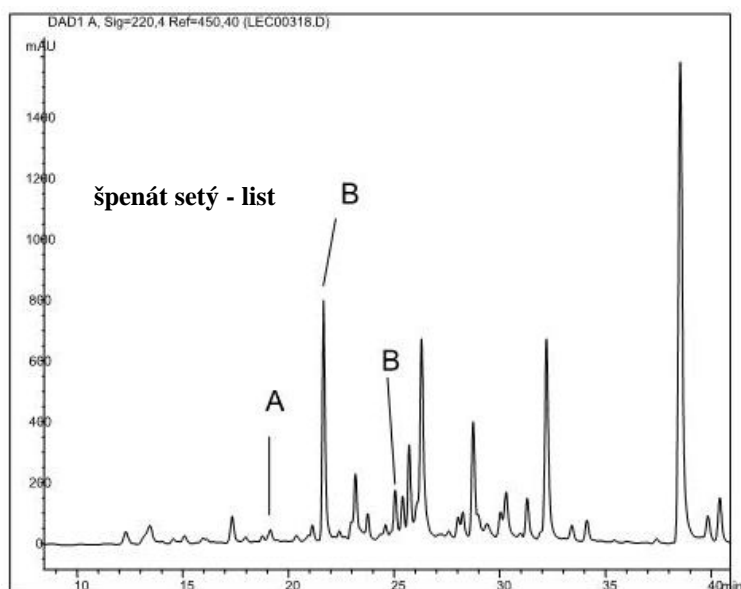
Obrázek 18. Záznam z analýzy HPLC – lebedy listy



1.5. Analýza fenolických sloučenin v listech rodu *Spinacia*

Chromatogram analýzy listů rodu *Spinacia* obsahuje látky se stejným spektrem, odpovídajícím flavonolu (pík B). Dále byly zaznamenány látky s UV spektrem podobným kávové kyselině (pík A).

Obrázek 19. Záznam z analýzy HPLC – špenát setý listy



1.6 Přehled stanovených fenolických látek metodou HPLC

V následujících tabulkách jsou uvedeny skupiny příbuzných látek a konkrétní sloučeniny, které byly prokázány metodou HPLC v jednotlivých druzích. Tabulka 5 uvádí zastoupení sloučenin v květenství, tabulka 6 v listech.

Tabulka 5. Porovnání výskytu fenolických látek v květenství analyzovaných rostlin

květenství	merlík bílý	merlík zvrhlý	merlík mnohosemenný	lebeda lesklá	lebeda rozkladitá	lebeda hrálovitá
látky s UV spektrem podobným kávové kyselině	–	–	+	–	–	–
látky se stejným spektrem odpovídajícím flavonolu	+	–	+	+	+	–
vanillová kyselina	+	–	–	–	–	–
epikatechin	+	+	+	+	+	+
neurčené látky se stejným spektrem	+	+	–	+	+	+

Tabulka 6. Porovnání výskytu fenolických látek v listech analyzovaných rostlin

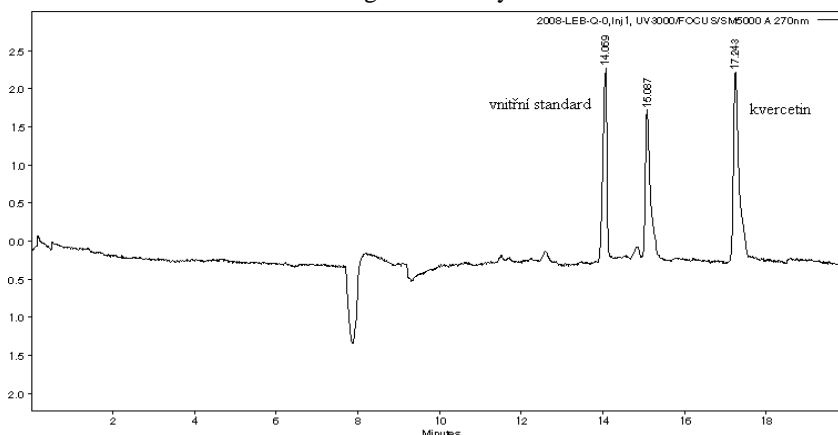
list	merlík bílý	merlík zvrhlý	merlík mnohosemenný	lebeda lesklá	lebeda rozkladitá	lebeda hrálovitá	špenát setý
látky s UV spektrem podobným kávové kyselině	+	-	+	-	-	-	-
látky se stejným spektrem odpovídajícím flavonolu	+	+	+	+	+	+	+
vanillová kyselina	-	-	-	-	-	-	-
epikatechin	-	-	-	-	-	-	-
neurčené látky se stejným spektrem	-	-	-	-	-	-	-

2. Stanovení obsahu celkového kvercetinu metodou MECC

Kvercetin patří svými biologickými účinky k významným antioxidantům obsažených přirozeně v lidské stravě. Může se vyskytovat jako aglykon, ale častěji je na uhlovodíkový skelet kvercetinu vázána glykosidicky cukerná jednotka. Z tohoto důvodu je analýza chápána jako stanovení celkového kvercetinu zahrnující všechny cukerné deriváty kvercetinu i aglykony.

Chemické analýze pomocí MECC byl podroben soubor 4 druhů z rodu lebed, 3 druhů z rodu merlíků a 1 druh rodu špenát. Všechny vzorky byly upraveny procesem lyofilizace, která probíhala po dobu 24 hodin, při teplotě $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ a tlaku 0.025 bar. Výsledky této analýzy byly sestaveny do tabulek (Tabulka 7, 8).

Obrázek 19. Záznam elektroforegramu lebedy – obsah celkového kvercetinu



Tabulka 7. Obsah celkového kvercetinu v květenstvích lyofilizovaných rostlin

rostlinný druh – květenství	obsah celkového kvercetinu (mg/kg sušiny)
lebeda rozkladitá	1300
lebeda lesklá	1270
lebeda hrálovitá	19,6
merlík bílý	789
merlík mnohosemenný	284
merlík zvrhlý	135

Nejvyšší hodnoty celkového kvercetinu v květenstvích dosahuje lebeda rozkladitá s lebedou lesklou, které mají výrazně vyšší obsah kvercetinu oproti ostatním sledovaným rostlinám. Nejméně celkového kvercetinu bylo stanoveno v lebedě hrálovitě.

Tabulka 8. Obsah celkového kvercetinu v listech lyofilizovaných rostlin

rostlinný druh – list	obsah celkového kvercetinu (mg/kg sušiny)
lebeda zahradní	4240
lebeda hrálovitá	2520
lebeda rozkladitá	2180
lebeda lesklá	506
merlík zvrhlý	3360
merlík bílý	2540
merlík mnohosemenný	215
špenát setý	1620

Nejvyšší hodnoty celkového kvercetinu v listech dosahuje lebeda zahradní. Jedná se o druh pěstovaný na zahrádkách stejně jako špenát setý. Ten v porovnání s lebedou zahradní obsahuje 2,6krát méně celkového kvercetinu. Druhých nejvyšších hodnot obsahu celkového kvercetinu dosahuje merlík zvrhlý. Střední koncentrace celkového kvercetinu byly zaznamenány u lebedy hrálovitě, lebedy rozkladité a merlíku bílého.

Nižších hodnot obsahu kvercetinu dosahuje merlík mnohosemenný a lebeda lesklá.

Všechny analyzované rostliny mají vyšší obsah celkového kvercetinu v listech oproti obsahu v kvercetinu v květenství. Výjimku tvoří lebeda lesklá – vyšší obsah

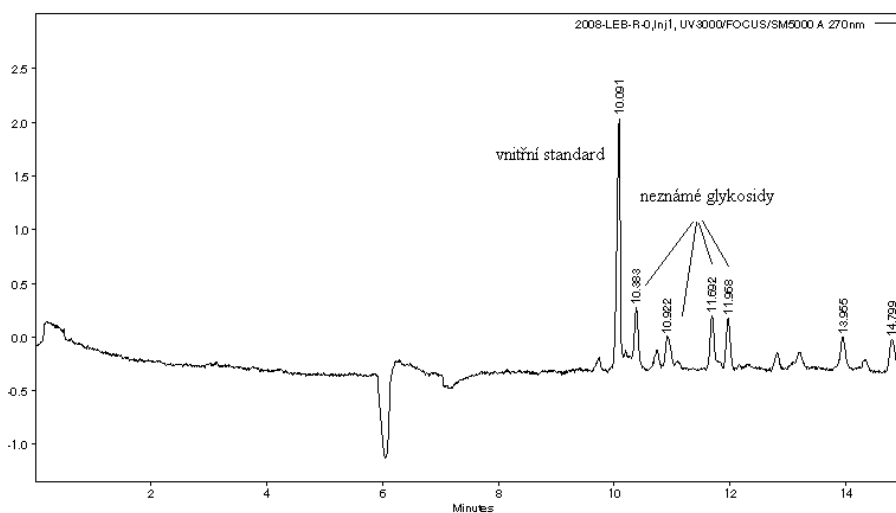
celkového kvercetinu je v květenství než v listech, a merlík mnohosemenný. Tento druh obsahuje přibližně stejné množství celkového kvercetinu jak v listech, tak v květenství.

Výrazný rozdíl při srovnání obsahu kvercetinu v květenstvích a listech je u lebedy hrálovité – analýza květenství má nejnižší obsah ze všech sledovaných rostlin, u analýzy listů patří lebeda hrálovitá k průměru.

3. Stanovení obsahu rutinu metodou MECC

Rutin (kvercetin-3-O-D-rutinosid) je nejběžnějším derivátem kvercetinu. Vyskytuje se v rostlinách v menších koncentracích než je tomu u kvercetinu. Chemické analýze pomocí MECC byl podroben stejný soubor vzorků jako pro analýzu obsahu celkového kvercetinu.

Obrázek 20. Záznam elektroforegramu lebedy – obsah rutinu



V tabulce 9 jsou uvedeny pouze 4 hodnoty stanovení obsahu rutinu, u zbylých vzorků obsah rutinu nepřesáhl mez stanovitelnosti metody.

Tabulka 9. Obsah rutinu v lyofilizovaných vzorcích

rostlinný druh	Obsah rutinu (mg/kg sušiny)
merlík bílý – list	868
merlík zvrhlý – list	850
merlík bílý – květ	828
merlík mnohosemenný – list	244

V případě analýzy lebedy zahradní je zřejmé, jak pestré je spektrum flavonolových glykosidů, které obsahuje. Jak na záznamu z analýzy HPLC (obrázek 17), tak na analýze pomocí MECC je vidět čtyři píky, jejichž spektrum odpovídá spektru typickému pro některý flavonol (označené jako látky B). Podle MECC analýzy list lebedy zahradní neobsahuje žádný rutin, obsah celkového kvercetinu je ale značný. Je tedy pravděpodobné, že neznámé glykosidy jsou glykosidy kvercetinu.

Totéž zřejmě platí i o ostatních druzích analyzovaných lebed. Ve všech je obsah rutinu pod mezí stanovitelnosti analytické metody. Podle obsahu celkového kvercetinu i podle HPLC spekter je zjevné, že obsahují více různých glykosidů kvercetinu. Všechny analyzované merlíky obsahují rutin v listech a merlík bílý i květenství, není to však jediný glykosid kvercetinu v nich přítomný.

Stanovení celkového obsahu kvercetinu se hodí v případech, kdy standardy všech analyzovaných sloučenin nejsou k dispozici a podá informaci o tom, jak je daný materiál bohatý na celkový obsah glykosidů daného aglykonu.

VII. ZÁVĚR

Obsah celkového kvercetinu a rutinu byl stanoven ve 2 kulturních druzích rostlin (lebeda zahradní a špenát setý) a 6 volně rostoucích druzích (lebeda rozkladitá, lebeda lesklá, lebeda hrálovitá, merlík zvrhlý, merlík bílý a merlík mnohosemenný) ze společné podčeledi Chenopodoideae. Analyzovanými částmi rostlin byly listy a květenství.

Nejvyšší obsah celkového kvercetinu byl nalezen v listech lebedy zahradní (4240 mg/kg sušiny). Nejvyšší obsah celkového kvercetinu v květenství byl nalezen u lebedy rozkladité (1300 mg/kg sušiny) a lebedy lesklé (1270 mg/kg sušiny). V listech byl stanoven vyšší obsah celkového kvercetinu než v květenství. Výjimku tvoří lebeda lesklá, u které byl nalezen vyšší obsah celkového kvercetinu v květenství než v listech.

Nejvyšší obsah rutinu byl stanoven v listech merlíku bílého (868 mg/kg sušiny) a listech merlíku zvrhlého (850 mg/kg sušiny). Obsah rutinu v květenství merlíku bílého byl také vysoký (828 mg/kg sušiny).

Výsledky analýz dvou nezávislých metod HPLC a MECC jsou ve shodě a vzájemně se doplňují.

VIII. SEZNAM LITERATURY

- BERLOW M. A., VAUGHN S. F. (1999): Higher plant flavonoids: Biosynthesis and chemical ecology. Principles and Practises of Plant Ekology. CrC Press. Illinois, USA, s. 423-438.
- CARNAT A. P., CARNAT A., FRAISSE D., LAMAISON J. L. (1998): The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*) tea. Pharm. Acta Helv., 72, s. 301 – 305.
- COOK N. C., SAMMAN S.(1996): Flavonoids – chemistry, metabolism, cardioprotective effects, aned dietary sources. J. Nutrit. Biochem. 7, s. 66-76.
- CORREIA H., GONZÁLES-PRAMÁS A., AMARAL M. T., SANTOS-BUELGA C., BATISTA M. T. (2006): Polyphenolic profile characterization of *Agrimonia eupatoria* L. by HPLC with different detection devices. Biomed. Chromatogr., 20, s. 88 – 94.
- DADÁKOVÁ E., VRCHOTOVÁ N., TRÍSKA J., KYSELÁKOVÁ M. (2003): Chemické listy 97, s. 558-561.
- DAVÍDEK J., JANÍČEK G., POKORNÝ J., (1983): Chemie potravin. SNTL. Praha. s. 255.
- DOLNÍK V. (1994): Úvod do kapilární elektroforézy. Ústav analytické chemie AV ČR, Brno.
- DRBAL K., KRÍŽEK M. (1999): Analytická chemie. ZF JU České Budějovice. ISBN 80-7040-352-7.
- FAJMON K., SIMONOVÁ D. (2008): Merlíky – opomíjení průvodci našich cest. Živa, Praha, Academia, 5, s. 205.
- GIL M.I., GARCÍA-VIGUERA C., BRIDLE P., TOMÁS-BÁBERÁN F. A. (1995): Analysis of phenolic compounds in Spanish red wines by capillary zone electrophoresis. Z. Lebensm. Unter. Forsch. 200, s. 278-281.

GOLDBERG D.M., YAN J., SOLEAS G. J. (2003): Clin. Biochem. 36, s. 79.

HÄSSING A., LIANG W. X., SCHWABL H., STAMPFLI K. (1999): Flavonoids and tannins: plant – based antioxidants with vitamin character. Med. Hypotheses, 52 (5), s. 479 – 481.

HAMPL R., LAPČÍK O. (1996): Jíte rádi flavonoidy? Vesmír. 1996, roč. 75, č. 3, s. 125.

HARMATHA J.(2002): Fenylypropanoidy, lignany a jejich biologické účinky. Chemie a biochemie přírodních látek, ÚOCHB, Praha, str. 117 – 143.

HARMATHA J. (2005): Strukturní bohatství a biologický význam lignanů a jim příbuzných rostlinných fenylypropanoidů. Chemické listy. 2005, roč. 99, č. 9, s. 622-632.

HEJNÝ S., SLAVÍK B. (1990): Květena České republiky 2. Academia, Praha.

HERTOG M. G. L., HOLLMAN P. C. H., VEMENA D. P. (1992a): Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. J. Agric. Food Chem., 40 (9), s. 1591 – 1598.

HERTOG M. G. L., HOLLMAN P. C. H., KATAN M. B. (1992b): Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. J. Agric. Food Chem., 40, s. 2379 – 2383.

HERTOG M.G.L., FESKENS E.J.M., HOLLMAN P.C.H., KATAN M.B., KROMHOUT D. (1993): Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. Lancet, 342, 1007-1011.

HERTOG M. G. L., KROMHOUT D., ARAVANIS CH., BLACKBURN H., BUZINA R., FIDANZA F., GIAMPAOLI S., JANSEN A., MENOTTI A., NEDELJKOVIC S., PEKKARINEN M., SIMIC B., TOSHIMA H. (1995): Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the Seven country study. Arch. Intern. Med., 155, s. 381-386.

HÍSEK K., DEYL M. (2002): Naše květiny. Academia, ISBN 80-200-0940-X. Dostupné na internetu: http://www.rozhlas.cz/online/portal/_zprava/597769. Staženo dne: 2.3.2010

HOLLMAN P.C.H., HERTOOG M.G.L., KATAN M.B. (1996): Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chem.*, 57 (1), s. 43 – 46.

HRON F., KOHOUT V. (1988): Plevelé polí a zahrad. Ministerstvo zemědělství a výživy ČSR. s.118-128.

KALÁČ P. (2001): Organická chemie přírodních látek a kontaminantů. ZF JU České Budějovice. ISBN 80-7040-520-1.

KREFT S., KNAPP M., KREFTI.(1999): Extraction of rutin from buckwheat (*Faipyrum esculentum* Moench) Seeds and Determination by capillary electrophoresis. *J. Agric. Food Chem.*, 47 (11), s. 4649-4652.

KUBÁT K., HROUDA L., CHRTEK J. jun., KAPLAN Z., KIRSCHNER J., ŠTĚPÁNEK J. (2002): Klíč ke květeně České republiky. Academia. Praha, 1. vydání.

LAHTINEN M., LEMPA K., SALMINEN J. P., PIHLAJA K. (2006): HPLC analysis of leaf surface flavonoids for the preliminary classification of birch species. *Phytochem. Anal.*, 17, s. 197 – 203.

PAVEL J. (1989): Biochemie rostlin – I. Vysoká škola zemědělská v Brně, ISBN neuved.

PAPP I., APÁTI P., ANDRASEK V., BLÁZOVICS A., BALÁZS A., KURSINSZKI L., KITE G. C., HOUGHTON P. J., KÉRY Á. (2004): LC-MS analysis of antioxidant plant phenoloids. *Chromatografia*, suppl. 60, s. 93 – 100.

PIETTA P.G., MAURI P.L., RAVA A., SABBATINI G.(1991): Application of micelar electrokinetic capillary chromatography to the determination of flavonoid drugs. *J.Chrom.* 549, s. 367-373.

RENAUD S., DE LORGERIL M.(1992): *Lancet* 339, s. 1523.

SLANINA J., TÁBORSKÁ E. (2004): Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. *Chem. Listy*, 98, s. 239 – 245.

STANLEY L. L., MAIZER M. J. P. (1999): Potential explanation for the French paradox. *Nutr. Res.*, 19(1), s. 3-15.

TOMLINSON C. T. M., NAHAR L., COPLAND A., KUMARASAMY Y., MIR-BABAYEV N. F., MIDDLETON M., REID R. G., SARKER S. D. (2003): Flavonol glykosides from the seeds of *Agrimonia eupatoria* (Rosaceae). *Biochem. Syst. Ecol.*, 31, s. 439 – 441.

TRNA J., TÁBORSKÁ E. Přírodní antioxidanty. Dostupné na internetu: <http://www.med.muni.cz/biochem/seminare/prirantiox.rtf>. Staženo dne 29.3.2010.

WELSH S. L., CROMPTON C. W., CLEMANTS S. E. (2003): Chenopodiaceae. *Flora of North America* Vol. 4. s. 258, 268, 302.

WIHKEL-SHIRLEY B. (2001): Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. – *Plant Physiol.*, 26 (2). s. 485 – 493. Dostupné na internetu: <http://www.plantphysiol.org/cgi/content/full/126/2/485>. Staženo dne 12. 2. 2010.

IX. PŘÍLOHY

Příloha 1. Schéma hlavních cest biosyntézy flavonoidů (Winkel – Shirley, 2001)

Výchozí dráhou je zde fenyylpropanoidový metabolismus, který vede k hlavním skupinám flavonoidů: bezbarvé chalkony, aurony, isoflavonoidy, flavony, flavonoly (šedě zvýrazněné produkty), a dále antokyany a kondenzované taniny (barevně zvýrazněné produkty). Fotografie ilustrují tři hlavní skupiny pigmentů u modelových rostlin jako je hledík, *Arabidopsis*, kukuřice, a petúnie. Další fotografie znázorňuje výrůstky tvořené rodem bakterií *Rhizobium*, který obsahuje flavony, stejně jako flavanony a isoflavony, v tomto případě na hlízkách jetele (*Melilotus alba*).

Důležitými enzymy této metabolické dráhy jsou: PAL = fenyllalaninamoniak lyáza, C4H = cinamát 4-hydroxyláza, 4CL = 4kumaryl - CoA lipáza, CHS = chalkon syntáza, CHI = chalkon isomeráza F3H = flavonon 3-hydroxyláza DFR = dihydroflavonol 4-reduktáza, ANS = antokyanidin syntáza, UFGT = UDP glukóza-flavonoid 3-O-glukosyl transferáza.

