

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
PEDAGOGICKÁ FAKULTA
KATEDRA APLIKOVANÉ CHEMIE A UČITELSTVÍ CHEMIE



**OPTIMALIZACE PODMÍNEK A POSTUPŮ PŘI
ZÍSKÁVÁNÍ BYLINNÝCH EXTRAKTŮ**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Kateřina Smutníková

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

České Budějovice 2012

Poděkování

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

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

Prohlašuji, že svou diplomovou práci na téma „Optimalizace podmínek a postupů při získávání bylinných extraktů“ jsem vypracovala samostatně s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu.

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

.....

V Českých Budějovicích
dne 10. 4. 2012

I. OBSAH

| | |
|--|----|
| I.OBSAH..... | 1 |
| Seznam zkratk..... | 3 |
| Abstrakt..... | 4 |
| Abstract..... | 5 |
| II.ÚVOD..... | 6 |
| III.TEORETICKÁ ČÁST | 7 |
| 1. Rostlinné metabolity..... | 7 |
| 1.1 Charakteristika sekundárních metabolitů | 7 |
| 1.2 Fenolické látky..... | 7 |
| 1.3 Fenolické kyseliny | 8 |
| 2. Kyselina chlorogenová | 9 |
| 3. Flavonoidy | 10 |
| 3.1 Výskyt..... | 10 |
| 3.2 Struktura | 11 |
| 3.3 Vlastnosti | 14 |
| 3.3.1 Role flavonoidů v rostlinách..... | 14 |
| 3.3.2 Vliv flavonoidů na zdraví člověka..... | 14 |
| 3.4 Využití flavonoidů..... | 15 |
| 4. Flavonoidy v rostlinách | 15 |
| 4.1 Bez černý (<i>Sambucus nigra</i> L.) | 16 |
| 4.1.1 Charakteristika druhu..... | 16 |
| 4.1.2 Využití | 16 |
| 4.2 Pohanka setá (<i>Fagopyrum esculentum</i> M.) | 17 |
| 4.2.1 Charakteristika..... | 17 |
| 4.2.2 Využití | 17 |
| 4.3 Rod laskavec | 18 |
| 4.3.1 Charakteristika..... | 18 |
| 4.3.2 Využití | 18 |
| 4.3.3 Druhy | 19 |
| 4.3.3.1 Laskavec červenoklasý (<i>Amaranthus hypochondriacus</i>)..... | 19 |
| 4.3.3.2 Laskavec krvavý (<i>Amaranthus cruentus</i>) | 19 |
| 5. Analytické metody..... | 20 |

| | |
|--|----|
| 5.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) | 20 |
| 5.2 Kapilární elektroforéza (CE) | 21 |
| 5.2.1 Varianty kapilární elektroforézy | 22 |
| 5.2.2 Kapilární zónová elektroforéza (KZE) | 22 |
| 5.2.3 Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MECC) | 24 |
| IV.CÍLE PRÁCE | 26 |
| V.EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 27 |
| 1. Použité chemikálie a standardy | 27 |
| 2. Laboratorní sklo a přístroje | 27 |
| 3. Odběr a úprava rostlinného materiálu | 28 |
| 4. Návrh experimentů | 29 |
| 4.1 Postup přípravy čaje | 29 |
| 4.2 Příprava extraktu | 30 |
| 5. Metodika stanovení rutinu pro MECC | 31 |
| 5.1 Postup stanovení | 31 |
| 5.2 Stanovení rutinu v kapalných vzorcích (čaje, extrakty) | 32 |
| 5.3 Měření na kapilární elektroforéze | 32 |
| 6. Metodika stanovení ostatních fenolických sloučenin metodou HPLC | 32 |
| 6.1 Identifikace vybraných fenolických sloučenin metodou HPLC | 33 |
| 6.2 Schéma použitého gradientu | 33 |
| VI.DISKUSE A ZÁVĚR | 34 |
| 1. Diskuse | 34 |
| 1.1. Stanovení optimálních podmínek čaje metodou MECC | 34 |
| 1.1.1. Příprava čaje z bezu černého | 36 |
| 1.1.2. Příprava čajů z ostatních rostlinných materiálů | 37 |
| 1.1.3. Vliv přídavku kyseliny askorbové na extrakci rutinu z bylin | 40 |
| 1.2. Podmínky skladování extraktů | 42 |
| 2. Závěr | 45 |
| VII.SEZNAM LITERATURY | 46 |
| VIII.PŘÍLOHY | 50 |

Seznam zkratk

| | |
|------|--|
| CE | kapilární elektroforéza (Capillary Electrophoresis) |
| CRA | kyselina chlorogenová (chlorogenic acid) |
| CZE | kapilární zónová elektroforéza |
| EOT | elektroosmotický tok (electroosmotic flow) |
| HPLC | vysokoučinná (vysokotlaká) kapalinová chromatografie (High – Performance (Pressure) Liquid Chromatography) |
| MECC | micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography) |
| SDS | laurylsíran sodný (sodiumdodecylsulfate) |
| WHO | světová zdravotnická organizace (World Health Organisation) |

Abstrakt

Práce se zabývá obsahem vybraných fenolických látek v některých druzích rodu *Amaranthus*, v černém bezu (*Sambucus nigra* L.) a v pohance (*Fagopyrum esculentum* M.). Fenolické sloučeniny jsou skupinou přírodních látek výhradně rostlinného charakteru. Flavonoidy představují pouze jednu skupinu fenolických látek. Flavonoidy vykazují mnohé příznivé biologické účinky, zejména působí jako antioxidanty. Přírodní flavonoidy působí jako prevence proti srdečním chorobám a dalším onemocněním spojené s vysokým věkem. Díky jejich biologickým účinkům se v posledních letech na výzkum flavonoidů obrací větší zájem.

Pro stanovení fenolických látek byly použity dvě nezávislé analytické metody. A to metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a metoda micelární elektrokinetické kapilární chromatografie (MECC). Metoda MECC byla použita pro stanovení rutinu a volného kvercetinu. Nejvyšší obsah rutinu byl nalezen v listech pohanky (76 400 mg/kg sušiny) a nejnižší obsah rutinu byl stanoven ve slupkách pohanky. Nejvyšší obsah rutinu byl pozorován u čaje z listů a květů pohanky. Toto množství koresponduje s obsahem rutinu obsaženém ve více než dvou pilulkách Ascorutinu (nejvyhledávanější flavonoidový preparát v České republice).

Metoda HPLC byla použita ke kvantitativnímu stanovení fenolických kyselin. Obsah volného kvercetinu byl sledován ve všech vzorcích čajů. Ethanolický extrakt z květenství bezu černého neobsahuje žádný volný kvercetin. Volný kvercetin nebyl nalezen ani v žádných čajích připravených popsány metodami.

Klíčová slova: fenolické látky, flavonoidy, rutin, kyselina chlorogenová, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, micelární elektrokinetická kapilární chromatografie, rod *Amaranthus*, bez černý, pohanka setá.

Abstract

The thesis deals with the content of selected phenolic compounds in some species of the genus *Amaranthus*, in black elderberry (*Sambucus nigra* L.) and buckwheat (*Fagopyrum esculentum* M.). Phenolic compounds are a group of natural compounds exclusively vegetable character. Flavonoids represent only one group of phenolic compounds. Flavonoids show many positive biological effects, in particular act as antioxidants. Natural flavonoids may cause to prevent from coronary- heard diseases and other diseases associated with older age. In recent years the increased attention is paid to flavonoid investigation due to its biological effects. For the determination of phenolic substances there were used two independent analytical methods. There are the high-performance liquid chromatography (HPLC) and micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC).

The MECC method was used for determination rutin and free quercetin. The highest content of rutin was found in leaves of buckwheat (76,400 mg/kg of dry weight) and the lowest content of rutin was determined in buckwheat hulls. The highest content of rutin was observed in teas from buckwheat leaves and inflorescence. This amount of rutin corresponds with rutin content in more than two pills of Ascorutin (the most favourite flavonoid medicament in the Czech Republic)

The HPLC method was used for quantitative determination of phenolic acids. The content of free quercetin was monitored in all samples. No free quercetin was found both in plant material and in samples of teas. The ethanolic extract from the elderberry inflorescence didn't contain any free quercetin. Free quercetin wasn't found in any further samples of teas, which were prepared by described methods.

Keywords: phenolic compounds, flavonoids, rutin, chlorogenic acid, High - Performance Liquid Chromatography, Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography, genus *Amaranthus*, black elderberry, buckwheat.

II. ÚVOD

Pohanka setá (*Fagopyrum esculentum* M.), bez černý (*Sambucus nigra* L.) a rod laskavec (*Amaranthus* sp.) jsou velmi bohatým zdrojem flavonoidů, které patří do velké skupiny fenolických sloučenin, a používají se také průmyslově pro jejich získávání. V laickém užití mohou sloužit k přípravě čajů a extraktů. Fenolické látky, kterou jsou ve velkém množství obsaženy v tomto rostlinném materiálu, jsme se pokusili kvantitativně i kvalitativně stanovit.

Byly zvoleny dvě nezávislé analytické metody. Metoda vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a metoda micelární elektrokinetické kapilární chromatografie (MECC). Metoda HPLC je pro stanovení fenolických látek používána ve velké míře. Její výhodou je vysoká citlivost, přesnost a schopnost analyzovat vzorky ve velmi malé koncentraci. Metoda MECC je méně používanou metodou, jejíž výhodou je krátká doba analýzy a vysoká rozlišovací schopnost.

Fenolické látky se řadí mezi sekundární rostlinné metabolity a jsou pro rostliny zdrojem mnoha specifických biologických účinků a vlastností.

Flavonoidy jsou významnou skupinou fenolických látek zejména z hlediska jejich pozitivních účinků na lidský organismus. Konzumace potravin obsahující vysoké množství flavonoidů působí jako prevence proti ateroskleróze, kardiovaskulárním a nádorovým onemocněním.

III. TEORETICKÁ ČÁST

1. Rostlinné metabolity

Rostliny syntetizují velké množství sloučenin, které se dělí podle funkce na primární a sekundární metabolity. Primární metabolity, které souvisí bezprostředně se základními funkcemi organismu, jsou hlavně nukleové kyseliny, sacharidy, lipidy a bílkoviny. Tyto sloučeniny se podílí na stavbě buněk. Sekundární metabolity nejsou bezprostředně důležité pro udržení života organismu (Ždárek, 2002).

1.1 Charakteristika sekundárních metabolitů

Sekundární metabolity mají funkce informativní, ochranné a ekochemické. Fungují jako regulátory a modulátory exprese genů. Hrají důležité role v odpovědi rostliny na stresové vlivy prostředí (např. teplotní změny, změny intenzity světla, ohrožení herbivory, kompetice mezi rostlinami a mikrobiální patogeny). Některé fungují jako pigmenty. Důležitá je nově objevená role sekundárních metabolitů v procesu předávání informací. Dále mohou sloužit některé speciální sekundární metabolity k vysledování vzájemné příbuznosti rostlin (Svatoš, 2002).

Mezi sekundární metabolity se řadí látky terpenické, fenolické látky, alkaloidy a polyaminy. Flavonoidy jsou pouze částí velké skupiny označované jako fenolické látky (Berhow a Vaughn, 1999).

1.2 Fenolické látky

Fenolické látky jsou rozsáhlou skupinou sekundárních metabolitů, které jsou syntetizované v cyklu kyseliny šikimové, neboli cestou skořicových kyselin (Harmatha, 2002). Rostlinám slouží jako stavební a strukturní složky, dále jako ochranné a signální látky, vonné, chuťové a barevné látky květů a plodů aj. Základním klíčovým meziproduktem biosyntézy je kyselina skořicová nebo její biogenetické ekvivalenty, tj. hydroxy (i methoxy) deriváty: kyselina kávová, ferulová, kumarová a sinapová. Z těchto klíčových látek pak vznikají další meziprodukty druhého stupně.

K jejich nejvýznamnějším a nejpočetnějším zástupcům patří lignany, fenolické kyseliny, flavonoidy, stilbeny a kumariny (Hartmatha, 2002).

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

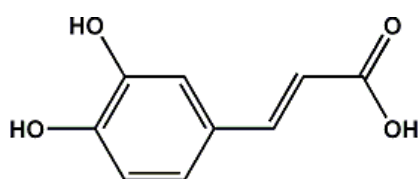
| Typy fenolický látek | Počet uhlíků | příklady |
|--|--------------|-----------------------|
| jednoduché fenoly, bezochinony | 6 | katechol, hydrochinon |
| fenolické kyseliny a aldehydy | 7 | kyselina salicylová |
| acetofenony, benzofurany, isobenzofurany | 8 | isobenzofuranon |
| fenylpropanoidy, benzopyranoidy, kumariny | 9 | chromen |
| naftochinony | 10 | juglon |
| ageratochromeny, prekoceny | 11 | prekocen I,II |
| dibenzofurany | 12 | difenylether |
| benzofenony a dibenzopyrany | 13 | difenylmethan |
| antrachinony a stilbeny | 14 | emodin |
| flavonoidy a chalkony | 15 | kvercetin |
| lignany a neolignany | 18 | |
| kondenzované taniny | n | gallotaniny |
| ligniny | n | |
| katecholmelaniny | n | rostlinné pigmenty |

1.3 Fenolické kyseliny

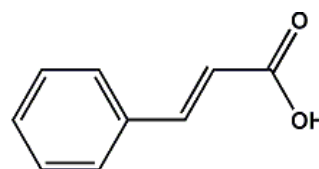
Fenolické kyseliny, jako je např. kyselina kávová, gallová nebo ferulová, se nacházejí v rostlinách ve formě esterů, v nichž se váží karboxylem na hydroxylové skupiny organických kyselin nebo sacharidů. Nejčastější látkou tohoto typu je kyselina chlorogenová (5-kafeoylchinová kyselina), která je přítomná v kávě, ale také v ovoci a zelenině a nejrůznějším rostlinném materiálu. Kyselina ferulová se

obvykle váže na polysacharidy buněčné stěny je tak součástí vlákniny. Kyselina gallová se vyskytuje rovněž ve formě esterů, kde např. v gallotaninech je vázaná na glukosu. Všem fenolickým kyselinám se přisuzují antioxidační a antikarcinogenní schopnosti (Slanina a Táborská, 2004).

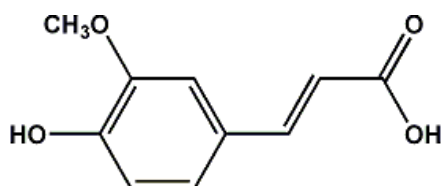
Obrázek 1. Vzorce fenolických kyselin



kyselina kávová



kyselina skořicová



kyselina ferulová

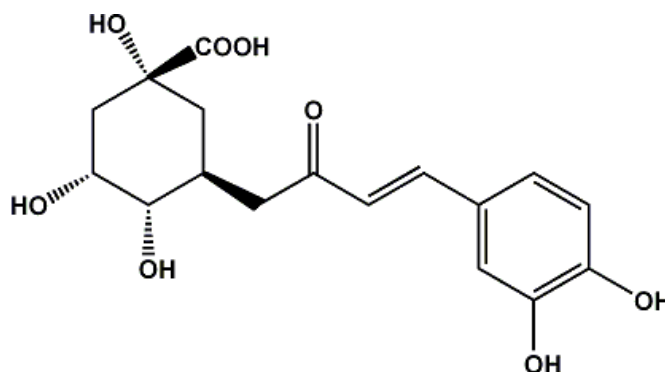
2. Kyselina chlorogenová

Tato kyselina je známá jako nejhojnější derivát kyseliny skořicové v lidské stravě. Je to ester kyseliny kávové a chinové. Bývá doprovázena svým izomerem, kyselinou neochlorogenovou. Nedávné výzkumy zjistily, že má antioxidační a antikarcinogenní účinky. Dále má antianalgetický, antipyretický, protizánětlivý a protiplísňový účinek. Na protizánětlivý účinek byl proveden experiment pomocí karagenanem indukovaného zánětu krysy. Jasný účinek zatím stanoven nebyl.

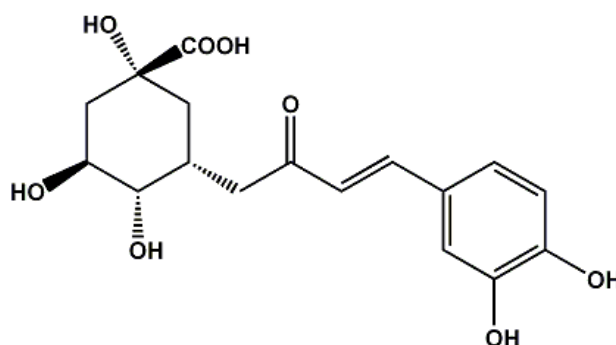
Kyselina chlorogenová má kladné účinky proti septické artritidě způsobenou kvasinkou *Candida albicans*. Pokus byl dělán na myších. Myši s artritidou byly

lčeny injekcí CRA (1mg/dávka/myš) intraperitoneálně. Otok se snížil o 40% oproti skupině, které CRA podávána nebyla. Tento účinek CRA dosahuje blokadí produkce oxidu dusnatého produkovaného makrofágy a potlačuje také růst kvasinky *Candida albicans*. Na základě analýzy bylo zjištěno, že 200 µg/ml CRA téměř zničilo růst této kvasinky (Lee et al., 2008).

Obrázek 2. Vzorec kyseliny chlorogenové



Obrázek 3. Vzorec kyseliny neochlorogenové



3. Flavonoidy

3.1 Výskyt

Flavonoidní látky, neboli flavonoidy jsou skupinou polyfenolických látek, rozdílných ve své struktuře a vlastnostech, které se nachází v rostlinách. Flavonoidy jsou běžnou součástí lidské stravy, protože lidé nejsou schopni, stejně jako zvířata, syntetizovat aromatické sloučeniny s benzenovým kruhem z alifatických prekurzorů (Hässig et al., 1999).

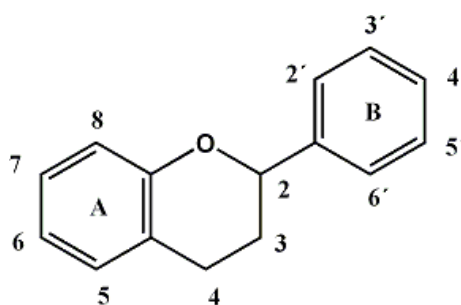
Flavonoidy se vyskytují zejména u krytosemenných rostlin, obzvláště v listech, květech a pylu, méně v plodech, semenech, kůře a kořenech. Nejvíce

flavonoidů je v nadzemních částech rostliny, v podzemních částech byla obvykle nalezena pouze stopová množství (Hertog et al., 1992).

3.2 Struktura

Flavonoidy obsahují v molekule dva benzenové kruhy spojené tříuhlíkovým řetězcem. Jedná se o uspořádání $C_6 - C_3 - C_6$. U většiny flavonoidů je C_3 řetězec součástí heterocyklické sloučeniny $2H$ – chromenu, substituovaného v poloze C – 2 fenylovou skupinou, který se nazývá flavan (Velíšek, 1999).

Obrázek 4. Vzorec flavanu



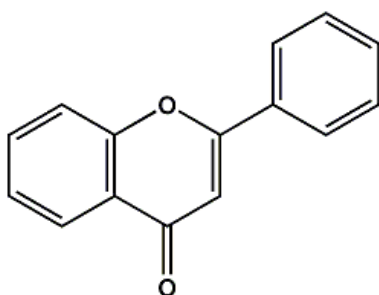
Flavanový skelet se tedy skládá ze dvou benzenových kruhů a kruhu odvozeného od $2H$ – pyranu. Běžně bývají všechny tři kruhy substituované hydroxyskupinami anebo methoxyskupinami. Jednotlivé deriváty se liší pouze stupněm oxidace. Vyskytují se jako volné látky nebo jako glykosidy (Velíšek, 1999).

Podle stupně oxidace C₃ řetězce rozeznáváme následující základní struktury flavonoidů:

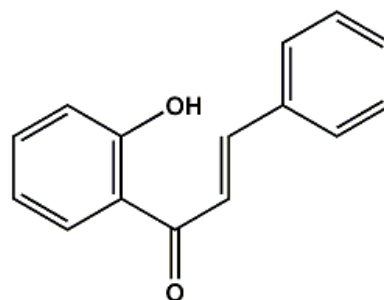
1. Flavony (obr. 3a)
2. Chalkony (obr. 3b)
3. Flavonoly (obr. 3c)
4. Flavanony (obr. 3d)
5. Anthokyaniny (obr. 3e)
6. Taniny
7. Aurony (obr. 3f)
8. Isoflavonoidy (obr. 3g)
9. Stilbeny

Obrázek 5. Chemické struktury některých skupin flavonoidů

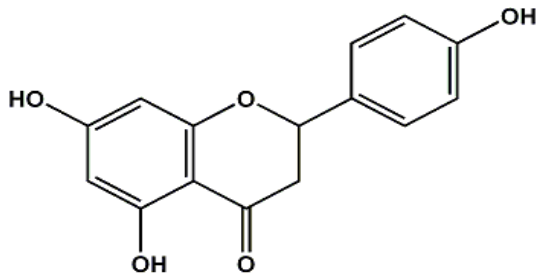
a) Flavony



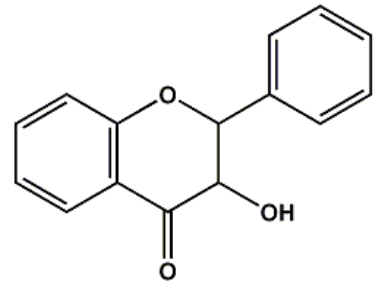
b) Chalkony



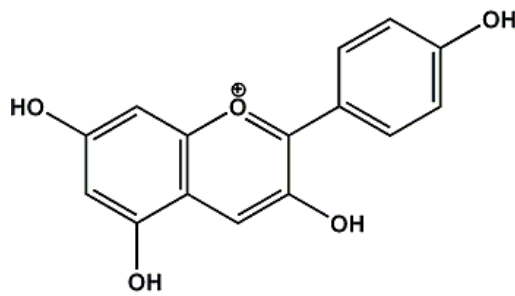
c) Flavonony



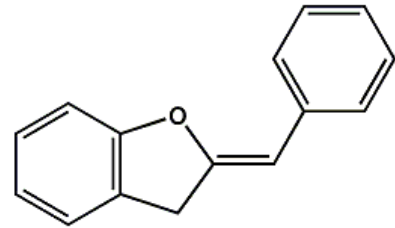
d) Flavanoly



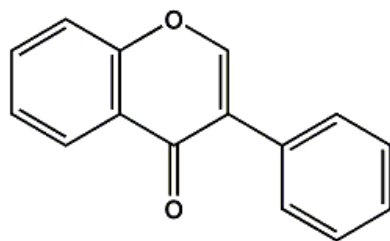
e) Anthokyaniny



g) Aurony



f) Isoflavonoidy



Flavonoidy se vyskytují obvykle jako O – glykosidy, které obsahují ve své molekule necukernou část (aglykon) a cukernou složku. Cukernou složkou může být například D – glukosa, D – galaktosa, L – rhamnosa, L – arabinosa, D – glukuronová kyseliny a D – xylosa. V rostlinách bylo nalezeno více než 80 různých cukrů vázaných na flavonoidy (Hollman et al., 1996). Téměř všechny hlavní glykosidy jsou substituovány v pozici 3, nejvíce je derivátů kvercetinu (Rhodes a Price, 1997). Nejčastěji je připojen jeden sacharid, někdy jsou substituovány dva či tři hydroxyly polyfenolu (Slanina a Táborská, 2004). Flavonoidy se ve volné formě vyskytují jen velmi omezeně a jako glykosidy jsou také stabilnější (Velíšek, 1999). U volného kvercetinu byla prokázána dokonce určitá mutagenní aktivita (MacGregor, 1986, Stavric, 1994, da Silva et al., 2002).

3.3 Vlastnosti

Flavonoidy jsou silné antioxidanty, chelátory kovů, inhibitory peroxidace lipidů a zachycují volné radikály. Strukturní nároky pro působení těchto látek jako antioxidanty a likvidátory radikálů zahrnují hydroxylovou skupinu v pozici tři, dvojnou vazbu mezi uhlíky v pozici dva a tři, karbonylovou skupinu na uhlíku v pozici čtyři a polyhydroxylaci aromatických kruhů A a B (Cook a Samman, 1996).

Jednotlivé skupiny flavonoidů nemají v rostlinách stejnou fyziologickou funkci. Mohou působit např. jako inhibitory nebo stimulanty růstu (Berlow a Vauhn, 1999).

3.3.1 Role flavonoidů v rostlinách

V cévnatých rostlinách bylo dosud identifikováno několik tisíc druhů flavonoidních sloučenin. Z důvodu rozdílnosti v růstu rostliny, podmínek a zralosti se liší v typu a množství. Rostliny si vyvinuly schopnost produkovat flavonoidy, aby se mohly bránit proti houbovým parazitům, býložravcům, patogenům a oxidativnímu poranění buňky. Dále pomáhají při opylování a navádějí hmyz k jeho zdroji potravy (Cook a Samman, 1996).

3.3.2 Vliv flavonoidů na zdraví člověka

Flavonoidy inhibují peroxidaci lipoproteinů, kapilární permeabilitu a snižují křehkost vlásečnic a tlumí aktivitu enzymových systémů zahrnujících

cyklooxygenázu a lipoxygenázu (Cook a Samman, 1996). Tyto dva enzymy hrají rozhodující roli při oxidaci krevních lipidů. Kvercetin, hlavní představitel flavonolů je silný antioxidant, předchází oxidaci lipoproteinů s nízkou hustotou. Lipoproteiny s nízkou hustotou (LDL) se považují za rozhodující prostředníky v utváření aterosklerotického plaku. Mnoho epidemiologických studií ukazuje opačný vztah mezi příjmem flavonoidů v potravě a úmrtností na srdeční onemocnění (Cook a Samman, 1996).

Některé studie naznačují, že příjem potravin obsahující flavonoidy může chránit organismus před některými formami rakoviny, především plic, trávicího traktu, rakoviny prsu u žen a prostaty u mužů. Řada experimentů na laboratorních zvířatech a nádorových buňkách prokázala antikarcinogenní účinky rostlinných polyfenolů. Flavonoidy mohou působit proti vzniku krevních sraženin a tímto způsobem snížit riziko infarktu myokardu či mozkové mrtvice (Slanina a Táborská, 2004, Hertog et al., 1993, Hertog et al., 1995, Hertog et al., 1997).

Řada studií ukázala, že flavonoidy mohou inhibovat enzymové systémy. Byly popsány účinky hlavních flavonů a flavonolů na 24 různých enzymů nebo enzymových systémů. Mnohé z těchto to enzymů jsou zapojeny do důležitých biochemických drah, které regulují buněčné dělení a růst, agregaci krevních destiček, detoxikaci a zánětlivé či imunitní reakce. Takže flavonoidy mají vliv na imunitní systém a na homeostázu (Hollman et al., 1996).

3.4 Využití flavonoidů

Využití je v terapii mnohostranné. Nejvíce se ale používají jako léky proti kornatění tepen a jako prostředky proti nepravidelnostem krevního oběhu. Flavonoidy podporují odolnost krevních vlásečnic. Jsou to látky upravující příznivě metabolismus lidí ve vysokém věku, a proto bývají součástí většiny geriatrických preparátů. Některé flavonoidní látky vykazují příznivý močopudný a antiseptický účinek, působí proti křečím a regenerují poškozenou jaterní tkáň atd. (Jirásek a Starý, 1986).

4. Flavonoidy v rostlinách

Rostliny jsou využívány jako zdroj potravy i pro lékařské účely už po staletí. Byliny hrají významnou roli v udržování zdraví člověka a zlepšování kvality života jako koření, barviv, léků, kosmetiky a cenné složky nápojů. Široká škála bylin, či dnes velmi populárních bylinných preparátů, obsahuje sloučeniny s biologickou aktivitou, které poskytují pomoc při běžných onemocněních, jakými jsou kašel, zácpa, nachlazení, horečka, nespavost, střešní potíže atd. Zájem je soustředěn na rostliny mající vlastnosti, které snižují riziko kardiovaskulárních onemocnění a rakoviny a které stimulují či posilují imunitní systém. K aktivním sloučeninám identifikovaným v širokém množství rostlin patří flavonoidy, které svými účinky vytváří ochranu proti chronickým onemocněním.

WHO odhaduje, že přibližně 80% obyvatel světa spoléhá na tradiční lékařství v péči o své zdraví, ale většina z těchto léčebných procesů zahrnuje používání rostlinných extraktů, nebo jejich aktivních složek. Kromě toho mnoho západních léčiv má v rostlinných extraktech svůj původ (Craig, 1999).

Je důležité také zdůraznit, že pouze správné určení a používání bylin je bezpečné a může poskytovat výhody, zatímco nesprávné nebo nadměrné užívání může být riskantní. Je známo, že mnoho rostlin působí jako lék v menších množstvích, ale ve vysokých dávkách mohou být toxické.

4.1 Bez černý (*Sambucus nigra* L.)

4.1.1 Charakteristika druhu

Řadí se do čeledi zimolezovité (*Caprifoliaceae*). Bez černý je keř, řidčeji i menší strom, v obrysu má půlkulovitý tvar. Kůra mladých větvíček je hladká a zelená, stará je šedá a rozpraskaná. Listy jsou lichozpeřené. Květy jsou uspořádané v chocholičnatém vrcholíku. Jednotlivé květy jsou pětičetné, korunní lístky žluté a kalich zelený, trubkovitý. Plodem je černofialová kulovitá peckovice. Kvete od začátku května do poloviny června (Randuška et al., 1983).

4.1.2 Využití

Jako léčivá část se používá květenství. Obsahuje velké množství rutinu a chlorogenové kyseliny. Rutin působí příznivě na stěnu žil a vlasečnic a zvyšuje jejich

odolnost vůči lámavosti. U kyseliny chlorogenové byla objevena výrazná protinádorová aktivita a výrazné antioxidační účinky.

Bez černý je oblíbenou a tradiční léčivkou zařazenou do Českého lékopisu (Randuška et al., 1983).

Obrázek 6. Bez černý (*Sambucus nigra* L.)



4.2 Pohanka setá (*Fagopyrum esculentum* M.)

4.2.1 Charakteristika

Pohanka je dvouděložná rostlina, která patří do čeledě rdesnovitých (*Polygonaceae*). Tahle jednoletá bylina, jejíž kolénkatý stonek dosahuje výšky 50 – 120 cm. Listy jsou řapíkaté a srdčité, po usušení stále zelené. Drobné pětičetné lístky jsou bílé či narůžovělé, uspořádané do květenství, kterým je lichoklas. Objevuje se tu tvorba dvou typů květů podle délky čnělek, tento jev se nazývá různocnělečnost (*heterostylie*) a pro opylení to nemá zvláštní význam. Plodem je trojboká nažka, která připomíná bukvici.

4.2.2 Využití

Požívala se k přípravě kaší z krup, které jsou lépe stravitelné než obilné kaše. Pohanka se řadí k dietním potravinám proto, že obsahuje řadu vitamínů (B1, B2, PP, P), rutin, minerální i organické látky. (Petr a Húska, 1997).

Obrázek 7. Pohanka setá (*Fagopyrum esculentum* M.)



4.3 Rod laskavec (*Amaranthus* sp.)

4.3.1 Charakteristika

Laskavec patří do čeledi laskavcovitých (*Amaranthaceae*) a řadí se k pseudocereáliím. Rod laskavec má asi 60 druhů, z nichž většina roste planě. Tato bylina patří k jednoletým, širokolistým rostlinám. Je to hluboce kořenící rostlina, která vytváří hlavní křovitý kořen s četným postranním větvením. Roste do výšky 90 – 180 cm. Má jednodomě mnohomanželné květy se suchomázdřitým okvětím nahloučeny v klubka, která sedí buď v paždí listů nebo skládají klasy. Plodem je tobolka (Rosypal et al, 2003).

4.3.2 Využití

Semena laskavce se využívá k přímé konzumaci, je součástí mnoha potravinářských výrobků a nachází uplatnění také v krmivářství. Semena se používají jako ingredience především při výrobě různých pekařských výrobků, těstovin, dětské výživy, instantních nápojů. Laskavec je vhodný pro bezlepkovou dietu. Amarantové zrno má, v porovnání s ostatními obilovinami, vysoký obsah dusíkatých látek. Bílkoviny mají vyšší biologickou hodnotu, obsahují větší množství lysinu a sirných aminokyselin. Tuk je složen převážně z nenasycených mastných kyselin. Součástí tukové složky je skvalen, který působí jako antioxidant, dále také obsahuje rutin,

který taktéž patří mezi antioxidanty. Má i vyšší obsah vápníku a železa. Z vitamínů obsahují zrna větší množství riboflavinu a vitamínu E (Barba de la Rosa et al., 2009).

4.3.3 Druhy

4.3.3.1 Laskavec červenoklasý (*Amaranthus hypochondriacus*)

Roste u nás jako plevel na rumišťích, u cest a na polích. Lodyha dosahuje výšky až přes 2 metry. Řapíkaté, střídavé listy jsou kopinaté, celokrajné a často tmavonachově zbarveny. Květenstvím je lata složená z klasů a plodem tobolka. Jako hospodářská plodina je pěstován zvláště ve Východní Indii (Macků a Krejča, 1988).

4.3.3.2 Laskavec krvavý (*Amaranthus cruentus*)

Jednoletý druh s přímou, lysou až útle pýřitou lodyhou. Má vejčité až vejčitokopinaté listy a květenstvím je lata složená z klasů. Pochází z Východní Indie a kvete v letních měsících (Macků a Krejča, 1988).

Obrázek 8. Rod laskavec (*Amaranthus sp.*)



5. Analytické metody

5.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

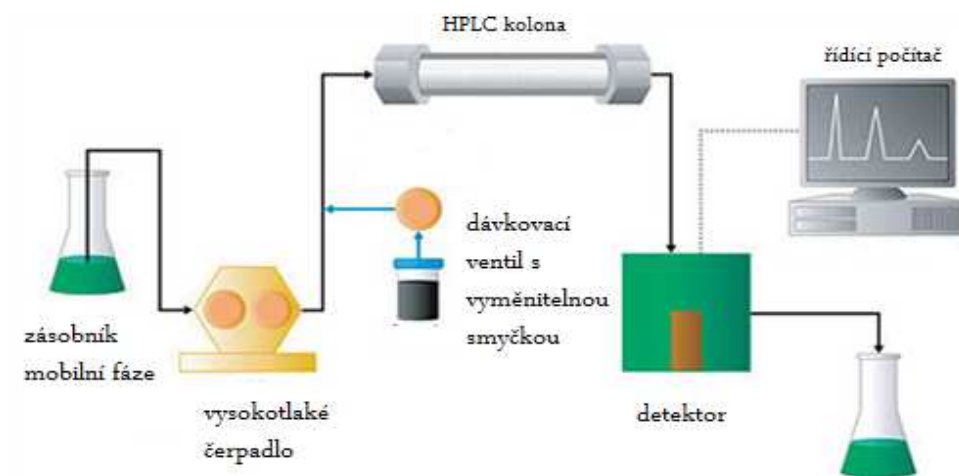
Chromatografie je analytická separační metoda, která využívá dělení mezi dvěma fázemi. Tato metoda umožňuje identifikovat a stanovit velké množství anorganických i organických látek. Fáze pohyblivá (plyn nebo kapalina), která prochází kolonou, se označuje jako fáze mobilní a fáze nepohyblivá (stacionární) má velmi rozdílnou formu. Pro jednoduchost se užívá označení sorbent pro jakoukoli formu stacionární fáze. Sorbentem je naplněna kolona, přes kterou určitou rychlostí postupuje mobilní fáze. Při styku mobilní a stacionární fáze s dělenými látkami vzorku dochází ke vzájemným interakcím, které mají rozhodující vliv na průběh separačního procesu.

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

Mobilní fáze je při isokratické eluci vedena ze zásobníku přes odplyňovač do vysokotlakého čerpadla. Při gradientové eluci jsou jednotlivé komponenty mobilní fáze přivedeny ze zásobníku do směšovače, kde se pak programově mísí ve zvoleném poměru a poté se dostávají do čerpadla. Odtud je mobilní fáze vedena přes tlumič pulzů čerpadla do kolony. Kolona je obvykle z nerez oceli či speciálního skla a je připojena na detektor. Používají se kolony rovné, o délce 10 až 20 s vnitřním průměrem od 0,2 do 2 cm. U přírodních vzorků se před vlastní kolonu přidává ještě předkolonka, která zabraňuje předčasnému znehodnocení kolony.

Jako čerpadla se hojně využívaly tzv. lineární dávkovače. Jedná se o válcovou komoru, kde se píst pohybuje podobně jako v injekční stříkačce. Dávkovat vzorky lze perforací pryžového septa mikrostríkačkou. V současnosti je zcela převažujícím způsobem nástřiku vzorku použití tzv. šesticestného ventilu s dávkovací smyčkou. Smyčka, která má známý konstantní objem, se naplní vzorkem, pak se kohout přepne do druhé polohy. Eluent proteče smyčkou a vnese vzorek do kolony (Drbal a Křížek, 1999).

Obrázek 9. Schéma HPLC sestavy



Pro detekci se nejčastěji používá průtokový fotometrický či fluorimetrický detektor. Eluát protéká měrnou celou malého objemu s velkou optickou délkou ($V = 5-10 \mu\text{l}$, $l = 10 \text{ mm}$). Při vhodně zvolené vlnové délce se registruje absorbance eluátu. Moderní přístroje jsou vybaveny detektory s proměnlivou a programově měnitelnou vlnovou délkou nebo tzv. detektorem s diodovým polem, který je schopný proměřit ve zvoleném okamžiku celé UV/VIS spektrum složky. Získaná informace je důležitým kvalitativním údajem o sledované složce.

Metoda HPLC se používá pro stanovení flavonoidů, dále se široce používá v průmyslu, zdravotnictví, farmacii a v mnoha dalších oborech (Drbal a Křížek, 1999).

5.2 Kapilární elektroforéza (CE)

Tato analytická metoda je založena na separaci látek vlivem elektrického pole, která se uskutečňuje v křemenné kapiláře. Skládá se ze dvou elektrod, které jsou umístěny do rezervoárů elektrolytu (obvykle tlumivého roztoku). Oba tyto rezervoáry jsou vodivě spojené médiem napuštěným elektrolytem. Jako medium se používá velmi tenká kapilára, nejčastěji z křemenného skla. Konstantní intenzitu elektrického pole zajišťuje vodivé spojení mezi anodou a katodou. Kationty a anionty se dají do pohybu opačnými směry různou rychlostí a rozdělí se na skvrny a zóny. Na distálním konci kapiláry je detektor.

Pro analýzu flavonoidů je kapilární elektroforéza používána v menší míře než kapalinová chromatografie. Jejími přednostmi je krátká doba analýzy, menší spotřeba pufrů, rozpouštědel a vysoká rozlišovací schopnost (Pieta et al., 1991).

5.2.1 Varianty kapilární elektroforézy

Rozlišujeme čtyři varianty kapilární elektroforézy. Jedná se o zónovou kapilární elektroforézu, izotachoforézu, micelární elektrokinetickou chromatografii a izoelektrickou fokusaci. Všechny tyto metody mohou být provozovány také v makroměřítku, kapilární formát je zde jednotícím prvkem kapilární elektroforézy. Separační principy u jednotlivých variant jsou dost odlišné. V zónové elektroforéze a izotachoforéze dochází k dělení na základě rozdílných pohyblivostí a v elektrokinetické micelární chromatografii na základě rozdílů rozdělovacích koeficientů mezi mobilní a pseudostacionární fázi. V izoelektrické fokusaci jsou separanty od sebe odděleny na základě rozdílů v isoelektrických bodech (Dolník, 1994).

5.2.2 Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

Pro zónovou elektroforézu je charakteristické použití jediného pracovního elektrolytu. V důsledku toho je v celé separační kapiláře konstantní elektrické pole (Dolník, 1994).

Při kapilární zónové elektroforéze jsou rezervoáry s tlumivým roztokem propojeny kapilárou vyplněnou také tlumivým roztokem. Kapiláry jsou vyrobeny ze syntetického křemene a před mechanickým poškozením jsou chráněny polyimidovým pokryvem.

Hlavní výhodou CZE je možnost zvyšovat svorkové napětí přístroje až k hodnotám 30 kV. Při těchto hodnotách napětí je generované teplo odvedeno stěnou kapiláry do okolního termostátového prostoru.

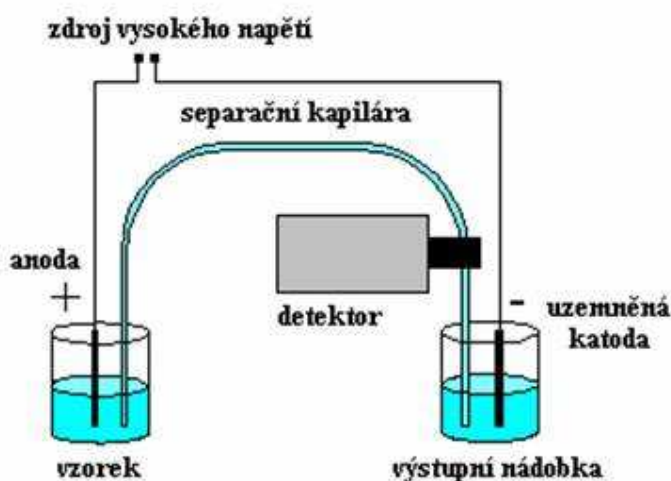
Další významnou vlastností křemenných kapilár je existence elektroosmotického toku kapaliny kapilárou. Vnitřní kapilární povrch se chová jako slabě kyselý katex. Při $\text{pH} > 2$ dochází se vzrůstem pH k nahrazování vodíkového protonu na vnitřním kapilárním povrchu za jiné ionty, které jsou složkou tlumivého

roztoku. Kationty migrují ke katodě a strhávají s sebou roztok v kapiláře. Proudění kapaliny kapilárou, které je vyvolané tímto jevem, říkáme elektroosmotický tok (EOT). Při $\text{pH} = 2$ je EOT nulový a se vzrůstem pH se zvyšuje. V důsledku existence EOT se všechny částice v dělené směsi pohybují jedním směrem.

Při separaci se kapiláry na jejím anodovém konci zavede vzorek (1-10 nl). Dávkované množství je asi 1000x menší, než u chromatografických metod. Oba konce kapiláry se ponoří do vhodného tlumivého roztoku a při 10 – 30 kV dojde v kapiláře k EOT, kterým jsou kationty i anionty transportovány k detektoru.

Přístroj pro CZE se skládá z analyzátoru, dvou elektrod, kapiláry, dále musí být přítomný rezervoár s tlumivým roztokem a detektor. Analyzátor pro CZE se skládá ze zdroje stabilizovaného vysokého napětí. Ze zdroje vychází dvě elektrody a každá je umístěna do rezervoáru s tlumivým roztokem. Předem je i vyplněna kapilára přemostňující oba rezervoáry. Délka kapiláry je 15 – 100 cm. Poblíž katodového konce je odstraněn její vnější polyimidový povlak v délce několika milimetrů. Tímto se vytvoří na kapiláře okénko, kterým příčně prochází ultrafialové či viditelné záření ze zdroje kapilárou do detektoru. Fotometrická detekce, podobně jako u HPLC, je tu nejobvyklejší (Drbal a Křížek, 1999).

Obrázek 10. Schéma aparatury pro kapilární zónovou elektroforézu (CZE)



Metoda KZE má uplatnění při separacích organických kyselin, aminů, alkoholů, aminokyselin, vitamínů, cukrů, fenolů, alkaloidů a mnoha dalších látek (Drbal a Křížek, 1999).

Kapilární elektroforéza se často používá pro analýzu flavonoidů v extraktech z léčivých rostlin (Pietta et al., 1991) i pro analýzu rutinu v pohance (Kreft et al., 1991). Dále se také používá pro stanovení fenolických látek v červeném víně (Gil et al., 1995)

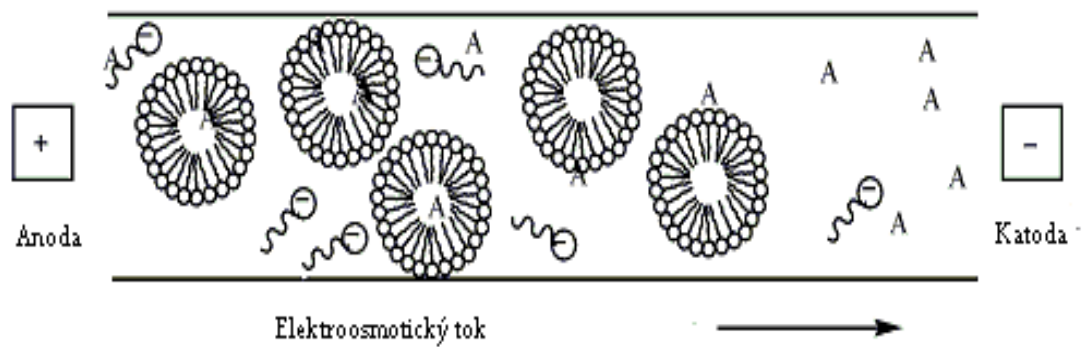
5.2.3 Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MECC)

Při micelární elektrokinetické chromatografii (MECC) obsahuje pracovní elektrolyt ionogenní smáčedlo v takové koncentraci, kdy vznikají micely (Dolník, 1994).

Technika MECC umožňuje použít KZE pro separaci elektroneutrálních látek. V tlumivém roztoku při MECC je rozpuštěna povrchově-aktivní látka (tenzid) v nadkritické koncentraci. Často se používá dodecylsulfát sodný. Působením tenzidu v roztoku dochází ke tvorbě micel. Nenabitě organické látky mohou interagovat s micelami podobně, jako v kapalinové chromatografii interagují se stacionární fází. Právě polarita látky rozhodne, jak dlouho se bude daná složka vzorku v hydrofobním jádře micely zdržovat.

Jestliže se látka ocitne mimo micelu, bude unášena EOT. Takže separace látek probíhá na základě nestejně četnosti a míře interakcí dělených nenabitých látek se systémem micel v tlumivém roztoku. Pro svou podobnost s chromatografickými metodami je tento systém nazýván jako pseudostacionární fáze (Drbal a Křížek, 1999).

Obrázek 11. Separace na MECC



IV. CÍLE PRÁCE

Z provedené literární rešerše vyplynulo, že mnohé léčivé rostliny jsou bohaté na fenolické látky, flavonoidy. Větší množství flavonoidů mohou obsahovat i mnohé zemědělské rostliny. Tyto látky vykazují mnohé příznivé biologické účinky, zejména fungují jako účinné antioxidanty. Podle posledních výzkumů se ukazuje, že přírodní flavonoidy mohou významným způsobem působit při prevenci tzv. civilizačních chorob (ateroskleróza, kardiovaskulární a nádorová onemocnění). Některé materiály (pohanka, černý bez, laskavec) jsou velmi bohatým zdrojem těchto látek a používají se také průmyslově pro jejich získávání. V laickém užití mohou sloužit k přípravě čajů a extraktů.

Pro stanovení celkového rutinu byla zvolena jako vhodná analytická metoda kapilární elektroforéza. Pro stanovení různých fenolických látek byla použita metoda HPLC.

Řešení bylo zaměřeno na následující cíle:

- Zjistit optimální postupy k získání extraktů nebo čajů s vysokým obsahem fenolických antioxidantů z různých materiálů.
- Navrhnout či ověřit podmínky skladování získaných extraktů.
- Zjistit zastoupení fenolických látek v léčivých rostlinách metodou kapalinové chromatografie (HPLC) a kapilární elektroforézy (CZE).
- Porovnat výskyt fenolických látek v jednotlivých rostlinných materiálech.

V. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

1. Použité chemikálie a standardy

Všechny používané chemikálie měly analytickou čistotu. 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 chlorovodíková (Lachema, ČR)

kyselina boritá (Lachema, ČR)

hydrogenuhlíčan sodný (Lachema, ČR)

hydroxid sodný (Lachema, ČR)

kyselina 1 – naftyloctová (Lachema, ČR)

kyselina L – askorbová (Merck, Německo)

rutin (Sigma Chemicals, USA)

kvercetin (Aldrich Chemie, Německo)

acetonitril (LiChrosolo Merck, Německo)

kyselina o . fosforečná (Aldrich Chemie, Německo)

methanol (Penta Chrudim, ČR)

kyselina kávová (Sigma Chemicals, USA)

2. Laboratorní sklo a přístroje

sada laboratorního skla (Fisher Scientific, Pardubice, ČR)

analytické váhy AB 204 (Mettler Toledo, Švýcarsko)

technické váhy Kern (Německo)

odstředivka Sigma 2 – 5 (Sigma Laborzentrifugen, Německo)

dávkovač kapalin 5 ml (Sklo Union, ČR)

pipety automatické, objem 20 – 200 μ l a 100 – 1000 μ l Transferpette (Treff AG, Švýcarsko)

vodní lázeň termostatovaná míchaná EL – 20 R (Kavalier, ČR)

kapilární elektroforéza SpectraPhoresis 2000 (Thermo Separation Product, USA)

SPE izolační jednotka (vývojové dílny JU, ČR)

filtry ze skleněných vláken GF/C (Whatman, Velká Británie)
 filtrační papír Filtrak (Filtrak GmbH, Německo)
 ultrazvuková lázeň Sonorex RK 31 (Německo)
 SPE kolony Strata – X (Phenomenex Inc., USA)
 SPE kolony RP- 18, RP – 18E, CN, SI, NH2 (Merck, Německo)
 pH – metr Inolab – 1, s elektrodou SenTix 61 (WTW, Německo)
 kapalinový chromatograf (Hewlett Packard T – 1050, USA)
 detektor Agilent 1100 DAD G1315B
 kolona: Phenomenex Luna C18 (2), 3 µm, 2 x 150 mm
 centrifuga (Hettich Universal 32 R, Německo)
 laboratorní mlýnek (Grindomix GM 200, Německo)
 lyofilizátor Alpha 1-2 (Christ, Německo)
 kombinovaná lednička s chladničkou (Bosch Cooler, Německo)
 teplovzdušná sušárna ULM (Memmert, Německo)

3. Odběr a úprava rostlinného materiálu

Analyzovali jsme dva druhy rodu *Amaranthus*, bez černý a pohanku setou. Amaranty a pohanka patří mezi pěstované druhy, pouze bez černý je volně rostoucí v České republice.

Tabulka 2. Odebrané vzorky

| | |
|-----------------------|--------------------------------------|
| bez černý | <i>Sambucus nigra</i> L. |
| pohanka setá | <i>Fagopyrum esculentum</i> M. |
| laskavec červenoklasý | <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L. |
| laskavec krvavý | <i>Amaranthus cruentus</i> L. |

Materiál poskytla doc. Jana Kalinová z katedry rostlinné výroby a agroekologie a byly vypěstovány na pokusném pozemku Zemědělské fakulty v roce 2010.

Bez černý se odebíral v červnu 2010, kde byla použita polorozvitá květenství bez hmyzu a zpracována podle Českého lékopisu 2009. Pohanka a laskavce byly odebrány v červenci 2010, jednotlivé části rostliny (listy a květenství) byly okamžitě

po odběru zamrazeny v polyethylenovém obalu při -18 °C. Do měsíce po odběru byl zmražený materiál lyofilizován za následujících podmínek: po dobu 24 hodin, při teplotě -60 °C a tlaku 0,02 mbar . Suchý materiál byl homogenizován na laboratorním mlýnku (umletý materiál). V umletém materiálu se stanovil základní obsah rutinu a dalších fenolických látek.

4. Návrh experimentů

Cílem bylo zjistit optimální podmínky přípravy čaje. Nejprve byla testována doba potřebná pro přípravu čaje. Jako pokusný materiál jsme zvolili bez černý (*Sambucus nigra* L.). Měla jsem 15 vzorků homogenního materiálu při navážce 1,5 g, které byly zality 150 ml vroucí vody (teplota vody byla 95 °C). Vzorky se nechali postupně louhovat 2 – 30 minut.

Stejný postup byl aplikován na ostatní čaje, jen testovaná doba byla 5, 10 a 15 minut.

4.1 Postup přípravy čaje

Navážka (1,5 g) sušeného homogenního materiálu byla zalita 150 ml vroucí vody (95 °C) ve skleněné nádobě (široká kádinka 600 ml). Po uplynutí dané doby byla kapalina slita přes mlynářské síto do odměrného válce, objem byl odečten a zaznamenán. Získaný vzorek byl po vychlazení odstředěn 10 minut při 3500 otáčkách za minutu. Kapalný vzorek byl uschován v PE vzorkovnici v mrazáku do analýzy.

Dále byl testován vliv kyseliny askorbové, tento přídatek byl přidán k materiálu před zalitím horkou vodou. Další postup přípravy byl stejný.

Tabulka 3. Identifikace vzorků

| Označení | Kód |
|----------|--------------|
| 1. | Koniz L |
| 2. | Koniz K |
| 3. | Amar L |
| 4. | Amar K |
| 5. | Pyra L |
| 6. | Pyra K |
| 7. | Pyra Sl-m |
| 8. | Pyra Sl-t |
| 9. | Bez K (2010) |

4.2 Příprava extraktu

Materiálem pro získání extraktu byl květ bezu černého (ČL 2009). Přibližně 10 g této byliny jsme smíchali s 200 ml absolutního ethanolu a 200 ml destilované vody. Směs byliny a rozpouštědel byla zahřívána 2 hodiny ve vodní lázni (85 °C) pod zpětným chladičem. Před uchováním ve skleněných uzavřených obalech byl připravený extrakt odstředěn (3500 otáček za minutu, po dobu 10 minut). Extrakty byly připravovány ve dvou opakováních a byly získány dva extrakty. Extrakty jsme skladovali ve třech různých podmínkách: lednice (5 °C), sklad (22 °C), parapet okna (22 °C). Celková doba uchování byla 6 měsíců a během této doby jsme prováděli odběry po 1. měsíci, dále 3. měsíci a na konci skladování. Cílem bylo zjistit chování rutinu při různých skladovacích podmínkách při delším skladování.

Pro analýzu vzorků získaných při řešení diplomové práce byly použity dvě analytické metody. Metoda HPLC byla použita pro analýzu fenolických kyselin a některých dalších fenolických látek ve vzorcích rostlin a metoda MECC sloužila ke kvantitativnímu stanovení rutinu a volného kvercetinu.

5. Metodika stanovení rutinu a volného kvercetinu pro MECC

Pro stanovení obsahu volného kvercetinu a rutinu se použila analytická metoda, která byla vyvinuta na pracovišti zemědělské fakulty Jihočeské univerzity, na katedře aplikované chemie, kde jsem také tuto diplomovou práci zpracovávala. Metoda vychází z publikované práce (Dadáková a Kalinová, 2010).

Používaná metoda se skládá z extrakce veškerých glykosidů přítomných ve vzorku. Dále následuje úprava vzorku odstředěním, filtrací a ředěním. Sorpce analytu se provádí na kolonkách SPE a analytická koncovka metodou kapilární elektroforézy v uspořádání s micelovou látkou (MECC).

5.1 Postup stanovení

Rutin (kvercetin – 3 – O – D – rutinosid) je nejběžnějším kvercetinovým glykosidem a vyskytuje se v mnoha rostlinných druzích. Při jeho stanovení stačí extrakce z rostlinného materiálu pomocí organického rozpouštědla. Ve stejném extraktu je možné stanovit volný kvercetin, pokud je přítomen.

Do 100 ml varné baňky byla vložena navážka asi 0,25 g lyofilizovaného homogenizovaného vzorku, váženého na analytických vahách s přesností na 0,1 mg, dále pak 12,5 ml methanolu, 12,5 ml vody a 80 mg kyseliny askorbové. Tato směs byla extrahována 1 hodinu pod zpětným chladičem v termostátované vodní lázni při teplotě 90 °C. Extrahovaný vzorek byl po vychlazení 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 se shromáždily v 600 ml kádince a doplnily se vodou na 200 ml. Dále bylo změřené pH vzorku a upravilo se na hodnotu pH = 3 pomocí roztoku HCl o koncentraci 1 mol/l.

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 kvantitativně převeden do 500 ml odměrné baňky, doplněn po rysku a promíchán. Tento roztok se použil pro SPE na kolonkách. Zachycené látky byly eluovány pomocí 1,4 ml methanolu do měrné vialky. Do vialky se přidalo 0,1

ml roztoku vnitřního standardu (methanolický roztok kyseliny 1 – naftyloctové o koncentraci 2 mg/ml). Takto připravený vzorek je před analýzou možno skladovat v lednici (5 °C) po dobu 4 týdnů.

5.2 Stanovení rutinu a volného kvercetinů v kapalných vzorcích (čaje, extrakty)

Do 600 ml kádinky bylo odměřeno 200 ml destilované vody, 25 ml ethanolu a dále se přidalo 80 mg kyseliny askorbové. Automatickou pipetou se připovalo 2,5 ml kapalného vzorku. Poté se měřilo pH této směsi a případně se upravilo na pH = 3 pomocí 1 M HCl. Dále se směs přefiltrovala přes filtr ze skleněných vláken na vakuovém filtračním zařízení a filtrát se kvantitativně převedl do 500 ml odměrné baňky, doplněn po rysku a promíchán. Bez ředění se roztok aplikoval na SPE kolonky. Zachycené látky byly eluovány pomocí 1,4 ml methanolu do měrné vialky. Do vialky se přidalo 0,1 ml roztoku vnitřního standardu (methanolický roztok kyseliny 1 – naftyloctové o koncentraci 2 mg/ml). Takto připravený vzorek je před analýzou možno skladovat v lednici (5 °C) po dobu 4 týdnů.

5.3 Měření na kapilární elektroforéze

Připravené vzorky byly měřeny na kapilární elektroforéze (SpectraPhoresis 2000) s použitím borátového 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 20 kV a teplota 25 °C. Rutin i kvercetin se odečítaly při 270 nm. Mez stanovitelnosti byla 10 mg/kg pro rutin, 5 mg/kg pro kvercetin. Obsah obou flavonoidů byl vyhodnocen pomocí kalibrační závislosti.

6. Metodika stanovení ostatních fenolických sloučenin metodou HPLC

Kromě obsahu rutinu a volného kvercetinu byly v čajích sledovány některé další fenolické sloučeniny. Jednalo se hlavně o kyselinu chlorogenovou a neochlorogenovou a další deriváty kyseliny kávové. Analýza byla provedena na pracovišti Centra výzkumu globální změny AV ČR v.v.i., v laboratoři metabolomiky a izotopových analýz pod vedením RNDr. Vrchotové, CSc.

6.1 Identifikace vybraných fenolických sloučenin metodou HPLC

Získané čaje byly přímo analyzovány na kapalinovém chromatografu Hewlett–Packard (HP 1050 HPLC, USA) s detektorem G1315B DAD a kolonou Luna C18 (2) (150 x 2 mm, 3 um) (Phenomenex, USA).

Jako mobilní fáze byla použita směs :voda, acetonitril, kyselina fosforečná. Jednotlivé mobilní fáze měly složení :

Mobilní fáze A: 5% acetonitril + 0,1% k. fosforečná

Mobilní fáze B: 80% acetonitril + 0,1% k. fosforečná

6.2 Schéma použitého gradientu

Byl použit gradient od 5% B do 35% B po dobu 55 minut při průtoku 0,25 ml/min a pracovní teplotě 25°C. Během analýzy bylo měřeno spektrum všech látek v rozsahu 190 – 600 nm, detekce látek probíhala při 220 nm. Sledované fenolické látky byly identifikovány srovnáním retenčního času a naměřeného spektra se standardem. Jako standardy pro kvantifikaci byly použity: kyselina chlorogenová, kyselina kávová (Sigma) a jejich obsah byl vyhodnocen podle kalibračních závislostí.

Obsah kyseliny neochlorogenové byl vyhodnocen podle kalibrační závislosti kyseliny chlorogenové. Obsah neznámých derivátů kyseliny kávové byl vyhodnocen sumárně jako kyselina kávová.

VI. DISKUSE A ZÁVĚR

1. Diskuse

Flavonoidy jsou látky rostlinného původu. Výzkumy v této oblasti potvrzují příznivé účinky na lidský organismus. Mají výrazné antioxidační vlastnosti, zabraňují peroxidaci lipidů, dále pak likvidují volné radikály kyslíku vazbou do chelátů a inaktivují některé prooxidační kovové ionty. Díky těmto vlastnostem se může snižovat riziko civilizačních chorob. Flavonoidy se mohou přijímat pouze v potravě.

Flavonoidy představují velkou skupinu sloučenin, tudíž lze předpokládat, že každý přírodní materiál bude obsahovat směs několika druhů těchto látek. Stanovení každé z nich by bylo velmi náročné, zejména díky nedostupnosti standardů.

Pro získání experimentálních dat o obsahu fenolických látek byly použity dvě nezávislé analytické metody a to metoda micelární elektrokinetické kapilární chromatografie (MECC) a metoda kapalinové chromatografie (HPLC).

Tato práce byla zaměřena na stanovení obsahu rutinu a obsahu volného kvercetinu v rostlinném materiálu běžně využívaných v České republice. Pro stanovení byla použita metoda MECC, jejíž výhodou je, že je zapotřebí pouze malé množství rozpouštědel a na organickou analýzu je poměrně jednoduchá. Pro stanovení obsahu dalších fenolických látek v rostlinném materiálu byla použita metoda HPLC.

Materiál, použitý pro tento výzkum, byl vypěstován na pokusném pozemku Zemědělské fakulty v roce 2010 nebo získán sběrem z volně rostoucích rostlin.

1.1 Stanovení optimálních podmínek čaje metodou MECC

Nejběžnějším glykosidem kvercetinu je rutin (kvercetin – 3 – O – D - rutinoid). Vyskytuje se v mnohém rostlinném materiálu, ale zdaleka není tolik rozšířený jako kvercetin. Rutin byl zjištěn pouze v několika léčivkách.

Tabulka 4. Přehled použitého materiálu

| Označení | Rostlina | Kód | Odebraná část |
|----------|---------------|-----------|--------------------|
| 1. | amarant Koniz | Koniz L | listy |
| 2. | amarant Koniz | Koniz K | květenství |
| 3. | amarant Amar | Amar L | listy |
| 4. | amarant Amar | Amar K | květenství |
| 5. | pohanka Pyra | Pyra L | listy |
| 6. | pohanka Pyra | Pyra K | květy |
| 7. | pohanka Pyra | Pyra Sl-m | slupky, mechanicky |
| 8. | pohanka Pyra | Pyra Sl-t | slupky, termicky |
| 9. | bez černý | Bez K | květenství |

Analýzou homogenního materiálu byl získán obsah rutinu. Bylo zjištěno, že nejvyšší obsah rutinu je v pohance seté (v listech a květech) a dále můžeme najít vysoké množství této látky v černém bezu. Stanovený obsah rutinu odpovídá také hodnotám uvedeným v literatuře (Dawidowicz et al., 2003). Zatímco množství rutinu ve slupkách pohanky bylo pod mezí stanovitelnosti. Výsledky byly sestaveny do tabulky (tab. 5.).

Tabulka 5. Obsah rutinu v některých rostlinných materiálech

| Označení | Kód | Obsah rutinu (mg/kg sušiny) |
|----------|-----------|-----------------------------|
| 1. | Koniz L | 16400 |
| 2. | Koniz K | 9930 |
| 3. | Amar L | 20000 |
| 4. | Amar K | 9850 |
| 5. | Pyra L | 76400 |
| 6. | Pyra K | 74000 |
| 7. | Pyra Sl-m | 296 |
| 8. | Pyra Sl-t | 263 |
| 9. | Bez K | 23600 |

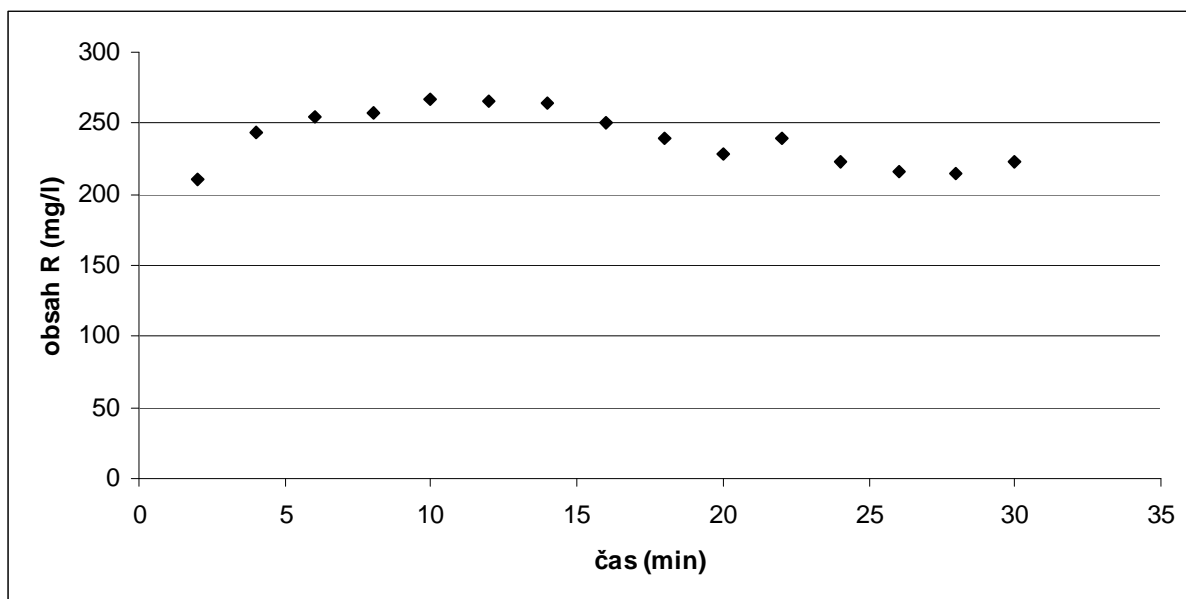
1.1.1 Příprava čaje z bezu černého

Pro zjištění optimálních podmínek přípravy čaje byl zvolen jako pokusný materiál bez černý (*Sambucus nigra* L.). Použila jsem 15 vzorků homogenního materiálu při navážce 1,5 g, které jsem zalila 150 ml vroucí vody (teplota vody byla 95 °C). Vzorky jsem nechala postupně louhovat 2 – 30 minut.

Tabulka 6. Závislost na délce extrakce

| Čas (min) | Obsah rutinu (mg/kg) |
|-----------|----------------------|
| 2 | 211 |
| 4 | 244 |
| 6 | 255 |
| 8 | 257 |
| 10 | 267 |
| 12 | 265 |
| 14 | 264 |
| 16 | 251 |
| 18 | 240 |
| 20 | 228 |
| 22 | 240 |
| 24 | 223 |
| 26 | 216 |
| 28 | 214 |
| 30 | 223 |

Graf 1. Závislost na délce extrakce



Jak je patrné z tabulky 6. a grafu 1., nejvhodnější doba extrakce se blíží desáté minutě. Obsah rutinu je maximální při extrakci trvajícím 10 – 15 minut. Tato doba je také všeobecně doporučována jako optimální pro přípravu bylinných čajů (Korbelář a Endris, 1985).

1.1.2 Příprava čajů z ostatních rostlinných materiálů

Na základě výsledků experimentu Čaje 1, kde byl využit pouze bez černý jako modelový materiál, byl proveden další pokus s použitím veškerého rostlinného materiálu. Z každého vzorku byla odebrána navážka 1,5 g, která byla zalita 150 ml vroucí vody (95 °C) ve skleněné nádobě (široká kádinka 600 ml). Po uplynutí dané doby byla kapalina slita přes mlynářské síto do odměrného válce, objem byl odečten a zaznamenán (tab. 7). Doba extrakce byla zvolena po 5, 10 a 15 minutách. Chtěli jsme potvrdit, zda doba 10 minut je vhodná a dostatečná pro extrakci rutinu i z jiných materiálů.

Tabulka 7. Závislost obsahu rutinu na délce extrakce

| | Obsah rutinu | Čas | Koncentrace | Navážka | Dávka | Objem | V čaji | % |
|--------------|-----------------|-------|-------------|---------|-------|-------|--------|-------|
| | (mg/kg) | (min) | (mg/l) | (g) | (mg) | (ml) | (mg) | |
| Koniz L | 16400 | 5 | 187 | 1,5 | 24,6 | 134 | 25,1 | 102,0 |
| | | 10 | 203 | 1,53 | 25,1 | 120 | 24,3 | 96,8 |
| | | 15 | 216 | 1,49 | 24,4 | 120 | 25,9 | 106,1 |
| Koniz K | 9930 | 5 | 109 | 1,5 | 14,9 | 126 | 13,7 | 91,9 |
| | | 10 | 116 | 1,5 | 14,9 | 118 | 13,7 | 91,9 |
| | | 15 | 128 | 1,51 | 15 | 122 | 15,6 | 104,0 |
| Amar L | 20000 | 5 | 264 | 1,5 | 30 | 108 | 28,5 | 95,0 |
| | | 10 | 270 | 1,49 | 29,8 | 112 | 30,2 | 101,3 |
| | | 15 | 266 | 1,5 | 30 | 118 | 31,4 | 104,7 |
| Amar K | 9850 | 5 | 128 | 1,5 | 14,8 | 124 | 15,9 | 107,4 |
| | | 10 | 124 | 1,51 | 14,9 | 118 | 14,6 | 98,0 |
| | | 15 | 130 | 1,5 | 14,8 | 116 | 15,1 | 102,0 |
| Pyra L | 76400 | 5 | 398 | 1,49 | 113,8 | 118 | 47 | 41,3 |
| | | 10 | 436 | 1,5 | 114,6 | 118 | 51,4 | 44,9 |
| | | 15 | 458 | 1,5 | 114,6 | 107 | 49 | 42,8 |
| Pyra K | 74000 | 5 | 427 | 1,49 | 110,3 | 104 | 44,4 | 40,3 |
| | | 10 | 538 | 1,5 | 111 | 102 | 54,9 | 49,5 |
| | | 15 | 384 | 1,51 | 111,7 | 106 | 40,7 | 36,4 |
| Pyra SL M | 296 | 5 | 2,16 | 1,49 | 0,44 | 140 | 0,3 | 68,1 |
| | | 10 | 1,94 | 1,51 | 0,45 | 134 | 0,26 | 57,8 |
| | | 15 | 2,16 | 1,5 | 0,45 | 132 | 0,29 | 64,4 |
| Pyra SL T | 256 | 5 | 1,29 | 1,5 | 0,38 | 138 | 0,18 | 47,4 |
| | | 10 | 1,26 | 1,5 | 0,38 | 134 | 0,17 | 44,7 |
| | | 15 | 1,43 | 1,5 | 0,38 | 134 | 0,19 | 50,0 |
| Bez K | 23600 | 5 | 238 | 1,5 | 35,4 | 120 | 28,6 | 80,8 |
| | | 10 | 263 | 1,5 | 35,4 | 124 | 32,6 | 92,1 |
| | | 15 | 271 | 1,5 | 35,4 | 122 | 33 | 93,2 |

Opět se potvrdilo, že nejvhodnější čas extrakce se pohybuje kolem 10 minut. Pouze u pohanky, ve srovnání s ostatním rostlinným materiálem, je výtěžek extrakce velmi nízký, pohybuje se okolo 50 %. Tak nízký výsledek může být pravděpodobně způsoben přítomností rušivých látek (ve formě slizu), které stěžovaly průběh celé extrakce. Také filtrace nápoje získaného z pohanky byla poměrně obtížná. Při analýze výsledků bylinných extraktů bylo také zjištěno, že se nikde nevyskytoval volný kvercetin.

Metodou HPLC byly zjišťovány další fenolické látky přítomné v bylinných extraktech. Výsledky byly zaznamenány do tabulky 8.

Tabulka 8. Obsah kyseliny chlorogenové, neochlorogenové a derivátů kyseliny kávové.

| vzorky | deriváty kyseliny kávové (mg/l) | neochlorogenová kyselina (mg/l) | chlororogenová kyselina (mg/l) |
|--------------|--|---------------------------------------|--------------------------------------|
| Koniz K | 36,93 | | |
| Koniz L | 16,12 | | |
| Amar K | 37,00 | | |
| Amar L | 12,99 | | |
| Pyra K | | | 92,93 |
| Pyra L | | 38,67 | 2,94 |
| Pyra sl M | | | |
| Pyra sl T | | | 0,25 |
| Bez K | 18,06 | 8,78 | 56,76 |

V černém bezu byla nalezena přítomnost derivátů kyseliny kávové, kyselina neochlorogenová a kyselina chlorogenová. Zatímco ve slupkách pohanky (mechanicky) se neobjevila ani jedna z těchto látek. Velmi vysoké množství

kyseliny chlorogenové obsahují květy pohanky seté. Nikde nebyl nalezen volný kvercetin.

1.1.3 Vliv přidavku kyseliny askorbové na extrakci rutinu z bylin

Při přípravě experimentu Čaje 2 byl postup stejný jako u experimentu Čaje 1. Pro přípravu čaje bylo použito 1,5 g vzorku a přidalo se 50 mg kyseliny askorbové. Tato směs byla zalita 150 ml vroucí vody (95 °C) ve skleněné nádobě (široká kádinka 600 ml). Po uplynutí 10 minut byla kapalina slita přes mlynářské síto do odměrného válce, objem byl odečten a zaznamenán (tab. 8.).

Tabulka 9. Vliv kyseliny askorbové na extrakci rutinu

| Vzorek | Obsah rutinu (mg/kg) | Vzorek | Koncentrace (mg/l) | Navážka (g) | Dávka (mg) | Objem (ml) | V čaji (mg) | % |
|--------------|----------------------------|--------|-----------------------|----------------|---------------|---------------|----------------|-------|
| Koniz L | 16400 | 1-AA | 199 | 1,5 | 24,6 | 124 | 24,7 | 100 |
| Koniz K | 9930 | 2-AA | 123 | 1,5 | 14,9 | 124 | 15,3 | 102,7 |
| Amar L | 20000 | 3-AA | 256 | 1,5 | 30 | 118 | 30,2 | 100,7 |
| Amar K | 9850 | 4-AA | 118 | 1,5 | 14,8 | 123 | 14,5 | 98 |
| Pyra L | 76400 | 5-AA | 729 | 1,5 | 114,6 | 104 | 75,8 | 66 |
| Pyra K | 74000 | 6-AA | 649 | 1,5 | 111 | 109 | 70,7 | 63,7 |
| Pyra SL M | 296 | 7-AA | 2,35 | 1,51 | 0,45 | 139 | 0,33 | 73,3 |
| Pyra SL T | 256 | 8-AA | 1,86 | 1,5 | 0,38 | 135 | 0,25 | 65,8 |
| Bez K | 23600 | 9-AA | 266 | 1,5 | 35,4 | 127 | 33,8 | 95,5 |

Přídavkem kyseliny askorbové nedošlo ke změně u černého bezu, který poskytl opět vysoký výtěžek extrakce, což můžeme pozorovat v posledním sloupci tabulky 9., totéž je možné sledovat u amarantů. U pohanky jsou výsledky vyšší díky tomuto přídavku, což může být způsobeno snížením obsahu rušivých látek. V jedné tabletě ascorutinu je 20 mg rutinu, podle výsledků v tabulce 9. a sloupci čaje si můžeme všimnout, že množství rutinu v čaji z černého bezu odpovídá jedné a půl tabletě ascorutinu, zatímco v čaji z pohanky (listy a květy) toto množství odpovídá více než třem tabletám ascorutinu. Nikde nebyl objeven volný kvercetin.

Dále byla provedena analýza přítomných fenolických sloučenin metodou HPLC. Přídavkem kyseliny askorbové se hodnoty téměř nezměnily. Výsledky jsou patrné v tabulce 10.

Tabulka 10. Vliv kyseliny askorbové na obsah kyseliny chlorogenové, neochlorogenové a derivátů kyseliny kávové

| vzorky | deriváty kyseliny kávové (mg/l) | neochlorogenová kyselina (mg/l) | chlorogenová kyselina (mg/l) |
|-----------|---------------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| Koniz K | 35,95 | | |
| Koniz L | 13,27 | | |
| Amar K | 37,64 | | |
| Amar L | 12,99 | | |
| Pyra K | | 1,57 | 99,45 |
| Pyra L | | 36,86 | 1,42 |
| Pyra sl M | | | 1,47 |
| Pyra sl T | | | 0,69 |
| Bez K | 56,95 | 22,18 | 138,42 |

Přídavek kyseliny askorbové měl pozitivní vliv na černý bez a ve slupkách pohanky (mechanicky), kde se hodnota zvýšila množstvím přítomných látek.

1.2 Změny obsahu rutinu při skladování ethanolickeho extraktu

Materiálem pro získání extraktu byl květ černého bezu, zpracovaný jako farmaceutická surovina (ČL 2009). Odvážené množství 10 g této byliny bylo smícháno s 200 ml absolutního ethanolu a 200 ml destilované vody. Směs byliny a rozpouštědel byla zahřívána ve vodní lázni 2 hodiny, po této době byla směs chlazená a odstředěna. Extrakty byly skladovány ve třech různých podmínkách: lednice (5 °C), sklad (22 °C), parapet okna (22 °C). Skladovací podmínky se výrazně lišily teplotou a osvětlením. Celková doba uchování byla 6 měsíců a během této doby byly prováděny odběry po 1. měsíci, dále 3. měsíci a na konci skladování. Cílem bylo zjistit chování rutinu při různých skladovacích podmínkách při delším skladování. Pro výpočet byl použit objem pro vzorek A i B 400 ml. Vše je patrné z tabulky 10.

Tabulka 11. Výchozí hodnoty obsahu rutinu v extraktu A a B

| Vzorek | Koncentrace (mg/kg) | v 400 ml | % |
|--------|------------------------|-------------|-------|
| 1A | 458 | 183,2 | 100,0 |
| 1B | 454 | 181,6 | 100,0 |

Tímto byly získány 100% hodnoty, podle kterých se srovnávaly údaje získané při různých skladovacích podmínkách.

Tabulka 12. Obsah rutinu ve skladovacích extraktech

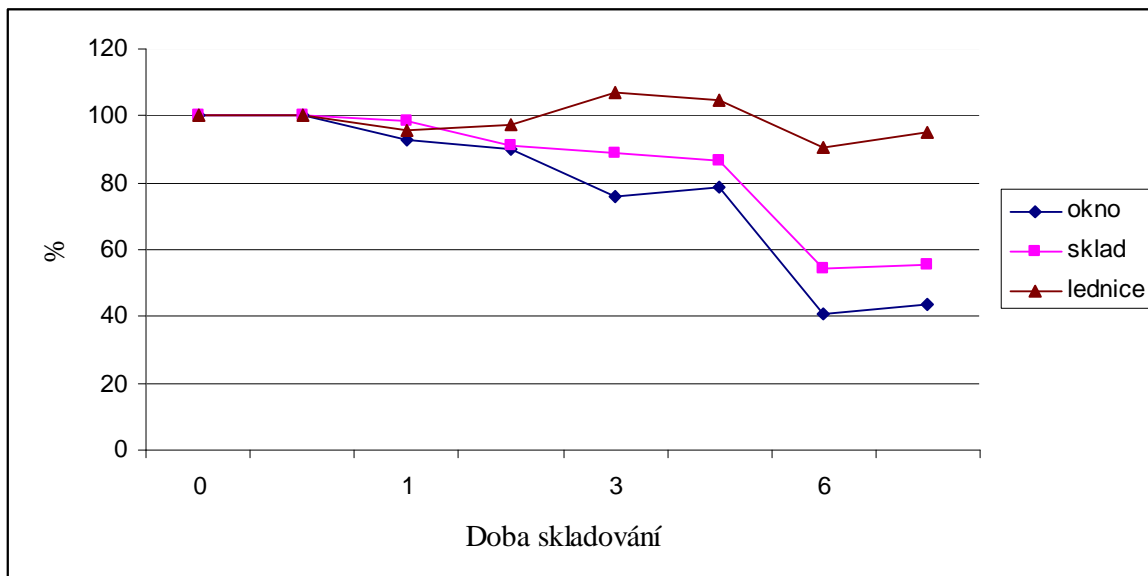
| Extrakt 1A | (mg/kg) | | | Extrakt 1B | (mg/kg) | | |
|------------|---------|-------|---------|------------|---------|-------|---------|
| | okno | sklad | lednice | | okno | sklad | lednice |
| 0 | 458 | 458 | 458 | 0 | 454 | 454 | 454 |
| 1 | 424 | 450 | 437 | 1 | 409 | 413 | 443 |
| 3 | 348 | 408 | 490 | 3 | 357 | 394 | 476 |
| 6 | 188 | 249 | 416 | 6 | 199 | 251 | 432 |

V tabulce 12. je procentické vyhodnocení výsledků ze skladování extraktů a pro lepší znázornění jsou tytéž výsledky zpracovány graficky.

Tabulka 13. Relativní obsahy ze skladování extraktů

| Extrakt 1A | % | | | Extrakt 1B | % | | |
|------------|-------|-------|---------|------------|-------|-------|---------|
| | okno | sklad | lednice | | okno | sklad | lednice |
| 0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 |
| 1 | 92,6 | 98,3 | 95,4 | 1 | 90,1 | 91,0 | 97,6 |
| 3 | 76,0 | 89,1 | 107,0 | 3 | 78,6 | 86,8 | 104,8 |
| 6 | 41,0 | 54,4 | 90,8 | 6 | 43,8 | 55,3 | 95,2 |

Graf 2. Obsah rutinu při dlouhodobém skladování ethanolickeho extraktu



Z výsledků pokusu je zřejmé, že ethanolickeho extrakt je nejvhodnější skladovat v lednici, kde je teplota 5 °C. Podmínky jsou nejšetrnější a nedochází k výraznějším změnám obsahu rutinu. Skladovat vzorky ve skladě, kde je tma a laboratorní teplota 22 °C, lze pouze krátkou dobu. Již po 3 měsících obsah rutinu výrazně klesal.

Parapet okna měl napodobit prostředí s velkými výkyvy teplot a osvětlení v podobných podmínkách. Tento způsob skladování je nevhodný pro jakýkoliv biologický materiál.

2. Závěr

Obsah rutinu a dalších fenolických látek (kyseliny chlorogenové, kyseliny neochlorogenové a derivátů kyseliny kávové) byl stanoven v rostlinách rodu *Amaranthus*, černém bezu a v pohance seté. Analyzovanými částmi rostlin byly listy, květy a květenství.

Nejvyšší obsah rutinu v lyofilizovaném materiálu byl naměřen v listech (76 400 mg/kg sušiny) a květech (74 000 mg/kg sušiny) pohanky seté a dále v černém bezu (23 600 mg/kg sušiny).

Nejvhodnější doba pro přípravu bylinných extraktů odpovídá 10 minutám.

Při extrakci čajů byl nejvyšší obsah rutinu naměřen v amarantech a opět v černém bezu. Zjistilo se, že přidavek kyseliny askorbové má pozitivní vliv na pohanku setou, ve které se našlo vyšší množství rutinu. Na ostatní bylinné extrakty neměl přidavek kyseliny askorbové žádný vliv. Nikde nebyl objeven volný kvercetin.

Při skladování bylinných extraktů je lednice jako nejvhodnější skladovací prostor, kde je teplota 5 °C a tma.

Metodou HPLC byly zjišťovány další přítomné fenolické sloučeniny (deriváty kyseliny kávové, kyselina chlorogenová, kyselina neochlorogenová). Všechny tyto látky byly objeveny v černém bezu, přidavkem kyseliny askorbové nedošlo k žádné změně. Volný kvercetin nebyl nalezen.

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

VII. SEZNAM LITERATURY

BARBA DE LA ROSA A. P., FOMSGAARD I. S., LAURSEN B., MORTENSEN A. G., OLVERA – MARTÍNEZ L., SILVA – SÁNCHEZ C., MENDOZA – HERRERA A., GONZÁLEZ – CASTAÑEDA J., DE LEÓN – RODRÍGUEZ A. (2009): Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) as an alternative crop for sustainable food production: Phenolic acids and flavonoids with potential impact on its nutraceutical quality. Journal of Cereal Science. Contents lists available at ScienceDirect. 49, s. 117 – 121.

BERLOW M. A., VAUGHN S. F. (1999): Higher plant flavonoids: Biosynthesis and chemical ecology. Principles and Practices of Plant Ecology. CRC Press. Illinois, USA, s. 423 – 438.

DADÁKOVÁ E., KALINOVÁ J. (2010): Journal of separation science. 33, s. 1633 – 1638.

DA SILVA J., HERRMANN S. M., HEUSER V., PERES W., POSSA MARRONI N., GONZÁLEZ – GALLEGUO J., ERDTMANN B. (2002): Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. Food Chem. Toxicol., 40, s. 941 – 947.

DAWIDOWITZ A. L., WIANOWSKA D., GAWDZIK J., SMOLARZ D. H. (2003): Optimization of ASE Conditions for the HPLC determination of rutin and Isoquercetin in *Sambucu nigra* L. J. Lig. Chromatogr. Rel. Tech., 26 (14), 2381 – 2397.

DOLNÍK V. (1994): Úvod do kapilární elektroforézy. Ústav analytické chemie AV ČR, Brno, s. 3 – 30.

CRAIG W. J. (1999): Health – promoting properties of common herbs. Am. J. Clin. Nut., 70, s. 491 – 499.

DRBAL K., KRÍŽEK M. (1999): Analytická chemie. ZF JCU České Budějovice. ISBN 80-7040-352-7.

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. Lebens. Unter. Forsch.* 200, s. 278 – 281.

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

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

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, s. 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 M. (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.

HERTOG M. G. L., SWEETNAM P. M., FENIKY A. M., ELWOOD P. C., KROMHOUT D. (1997): Antioxidant flavonoids and ischemic heart disease in a

Welsh population of men: the Caerphilly study. *Am. J. Clin. Nutr.* 65, s. 1489 – 1494.

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.

JIRÁSEK V., STARÝ F. (1986): Atlas léčivých rostlin, SPN Praha, s. 368.

KORBELÁŘ J., ENDRIS Z. (1985): Naše rostliny v lékařství. Avicenum. Praha, s. 492.

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

MACGREGOR J. T. (1986): Mutagenic and carcinogenic effects of flavonoids. In: *Plant Flavonoids in Biology and Medicine*. A. R. Liss Inc., New York, s. 411 – 424.

MACKŮ J., KREJČA J. (1988): Atlas léčivých rostlin. VEDA, VSAV, Bratislava, s. 120.

LEE J. H., PARK J. H., KIM Y. S., HAN Y. (2008): Chlorogenic acid, polyphenolic compound, treats mice with septic arthritis caused by *Candida albicans*. *International Immunopharmacology* 8, s. 1681 – 1685.

PETR J., HÚSKA J. (1997): Speciální produkce rostlinná – 1. Agronomická fakulta ČZU v Praze, s. 25, 185 – 188.

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

RANDUŠKA D., ŠOMŠÁK L., HÁBEROVÁ I. (1983): *Obzor*, n. p., Bratislava, s. 190.

RHODES M. C. J., PRICE K. R. (1997): Identification and analysis of plants phenolic antioxidants. *Eur. J. Cancer Prev.*, 6, s. 518 – 521.

ROSYPAL S., DOŠKAŘ J., FRYNTA D., HOMOLA J., HORÁČEK I., HŮRKA K., KALINA T., KUBIŠTA V., KVAČEK Z., LINC R., LOSOS B., MAZURA I., MLADÁ J., MLADÝ F., NEDVÍDEK J., NOVOTNÝ I., PAVLOVÁ L., PIKÁLEK P., PRÁŠIL K., PSOTA V., ROČEK Z., SLAVÍKOVÁ J., SLAVÍKOVÁ Z., SMRŽ J., ŠAŠEK V., ŠEBÁNEK J., ŠMARDA J., ŠTYS P., ZRZAVÝ J. (2003): Nový přehled biologie. Scientia, spol. s.r.o., pedagogické nakladatelství, Praha, s. 287.

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

STAVRIC B. (1994): Quercetin in our diet: from potent mutagen to probable anticarcinogen. *Clin. Biochem.* 27 (4), s. 245 – 248.

SVATOŠ A. (2002): Úvod do chemie přírodních látek. In: *Chemie a biochemie přírodních látek*, ÚOCHB, Praha, s. 1 – 24.

VELÍŠEK J. (1999): *Chemie potravin 3*. OSSIS, Pelhřimov. ISBN – 80 – 902391 – 5 – 3, s. 19 – 35.

ŽDÁREK J. (2002): Fyziologické a ekologické funkce přírodních látek. In: *Chemie a biochemie přírodních látek*, ÚOCHB, Praha, s. 25 – 78.

VIII. PŘÍLOHY

Obrázek v příloze 1. ilustruje způsob přípravy čaje. Navážka 1,5 g sušeného materiálu byla zalita 150 ml vroucí vody (95 °C) ve skleněné nádobě (široká kádinka 600 ml). Přitom byl sledován stanovený čas (10 minut).

Získaný vzorek byl po ochlazení odstředěn 10 minut při 3500 otáčkách za minutu, což je patrné na obrázku v příloze 2..

Příloha 1. Příprava čajů



Příloha 2. Odstředování kapalných vzorků

