

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



**STABILITA VYBRANÝCH FENOLICKÝCH LÁTEK**  
**V MODELOVANÉM PROSTŘEDÍ ŽALUDKU**

**Diplomová práce**

**Lukáš Sedláček**

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

**České Budějovice 2013**

### **Poděkování:**

Rád bych poděkoval vedoucí diplomové práce Ing. Evě Dadákové, Ph.D. za pomoc, odborné vedení, trpělivost a cenné připomínky při psaní této práce. Rád bych poděkoval RNDr. Naděždě Vrchotové, CSc. za pomoc, výsledky a trpělivost při práci s HPLC a také bych rád poděkoval Ing. Tamaře Pelikánové, která mi byla nápomocná při přípravování vzorků.

Prohlašuji, že svou diplomovou práci na téma „Stabilita vybraných fenolických látek v modelovaném prostředí žaludku“ jsem vypracoval samostatně za použití pramenů a literatury zapsaných 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 8. 5. 2013

|  |    |
|--|----|
| OBSAH  | 4  |
| Abstrakt   | 7  |
| Abstract   | 8  |
| 1. ÚVOD  | 9  |
| 2. TEORETICKÁ ČÁST   | 11 |
| 2.1 FENOLICKÉ KYSELINY   | 11 |
| 2.1.1 Významné fenolické kyseliny a jejich význam  | 11 |
| 2.1.2 Ferulová kyselina  | 11 |
| 2.1.3 Chlorogenová kyselina  | 12 |
| 2.1.4 Vlastnosti fenolických kyselin   | 12 |
| 2.1.5 Další fenolické deriváty   | 13 |
| 2.2 FLAVONOIDY   | 13 |
| 2.2.1 Struktura  | 13 |
| 2.2.2 Výskyt   | 17 |
| 2.2.2.1 Flavanoly  | 17 |
| 2.2.2.1.1 Kvercetin  | 17 |
| 2.2.2.1.1.1 Vlastnosti kvecetinu   | 18 |
| 2.2.2.1.2 Rutin  | 18 |
| 2.2.2.1.2.1 Vlastnosti rutinu  | 19 |
| 2.2.2.2 Flavanony  | 20 |
| 2.2.2.3 Proantokyanidiny   | 20 |
| 2.2.2.4 Antokyanidiny  | 21 |
| 2.2.2.5 Isoflavonoidy  | 21 |
| 2.2.2.6 Stilbeny   | 22 |
| 2.2.2.7 Výskyt polyfenolů v určitých typech potravy  | 23 |
| 2.2.3 Vlastnosti   | 24 |
| 2.3 DISTRIBUCE A FUNKCE FLAVONOIDŮ V ROSTLINÁCH  | 26 |
| 3. ZKOUMANÉ VZORKY A JEJICH CHARAKTERISTIKA  | 27 |
| 3.1 ROD LASKAVEC ( <i>Amaranthus Sp.</i> ) – ČELEĎ: LASKAVCOVITÉ<br>( <i>Amaranthaceae</i> ) | 27 |
| 3.1.1 Charakteristika druhu  | 27 |
| 3.1.2 Využití  | 27 |
| 3.1.3 Druhy  | 28 |

|  |    |
|--|----|
| 3.1.3.1 Laskavec červenoklasý ( <i>Amaranthus hypochondriacus</i> )                                    | 28 |
| 3.1.3.2 Laskavec krvavý ( <i>Amaranthus cruentus</i> )   | 28 |
| 3.2 POHANKA SETÁ ( <i>Fagopyrum esculentum moench</i> ) – ČELEĎ: RDESNOVITÉ<br>( <i>Polygonaceae</i> ) | 29 |
| 3.2.1 Charakteristika  | 29 |
| 3.2.2 Využití  | 29 |
| 3.3 BEZ ČERNÝ ( <i>Sambucus nigra L.</i> ) – ČELEĎ: BEZOVITÉ ( <i>Sambucaceae</i> )                    | 30 |
| 3.3.1 Charakteristika  | 30 |
| 3.3.2 Využití  | 30 |
| 4 FYZIOLOGIE TRÁVENÍ A VSTŘEBÁVÁNÍ   | 32 |
| 4.1 GIT (gastrointestinální trakt)   | 32 |
| 4.2 Trávení v ústech   | 33 |
| 4.3 Sliny  | 33 |
| 4.3.1 Slinné žlázy   | 34 |
| 4.4 Jícen  | 34 |
| 4.5 Žaludek  | 34 |
| 4.5.1 Sliznice žaludku   | 35 |
| 4.5.2 Žaludeční sekrece  | 35 |
| 4.5.3 Tvorba a sekrece HCl   | 35 |
| 4.5.3.1 Kyselina chlorovodíková  | 36 |
| 4.5.4 Pepsiny  | 36 |
| 4.5.5 Hlen   | 36 |
| 5 ANALYTICKÉ METODY  | 37 |
| 5.1 ELEKTROFORÉZA  | 37 |
| 5.1.1 Kapilární a zónová elektroforéza (CZE)   | 38 |
| 5.1.2 Specifika kapilární zónové elektroforézy   | 39 |
| 5.1.3 Separace metodou kapilární zónové elektroforézy  | 40 |
| 5.1.4 Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MECC)                                       | 40 |
| 5.1.5 Přístroje pro kapilární zónovou elektroforézu  | 40 |
| 5.1.6 Využití kapilární elektroforézy  | 41 |
| 5.2 VYSOKOÚČINNÁ KAPILÁRNÍ CHROMATOGRAFIE (HPLC)   | 42 |
| 5.2.1 Přístroje pro kapalinovou chromatografii   | 42 |
| 5.2.2 Čerpadla u HPLC a dávkování vzorků   | 43 |

|   |    |
|---|----|
| 5.2.3 Kolony pro HPLC   | 43 |
| 5.2.4 Rozdělení HPLC podle použitých adsorbentů                                   | 44 |
| 5.2.4.1 Kapalinová adsorpční chromatografie (LSC)                                 | 44 |
| 5.2.4.2 Kapalinová rozdělovací chromatografie (LLC)                               | 44 |
| 5.2.4.3 Chromatografie na reverzní fázi   | 45 |
| 5.2.5 Detektory pro HPLC  | 45 |
| 5.2.6 Kvalitativní a kvantitativní analýza  | 45 |
| 5.2.7 Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie                              | 46 |
| 6. CÍLE PRÁCE   | 47 |
| 7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST  | 48 |
| 7.1 Použité chemikálie a standardy  | 48 |
| 7.2 Laboratorní sklo a přístroje  | 48 |
| 7.3 Odběr a úprava rostlinného materiálu  | 49 |
| 7.4 Uspořádání a úprava rostlinného materiálu                                     | 50 |
| 7.4.1 Návrh experimentu žaludku   | 50 |
| 7.4.1.1 Simulace trávení v žaludku  | 50 |
| 7.4.2 Metodika stanovení pro MECC   | 51 |
| 7.4.2.1 Stanovení rutinu a volného kvercetinu v rostlinných vzorcích metodou MECC | 51 |
| 7.4.2.2 Stanovení rutinu a volného kvercetinu v kapalných vzorcích                | 52 |
| 7.4.3 Metodika stanovení pro HPLC   | 53 |
| 7.4.3.1 Extrakce pro stanovení HPLC   | 53 |
| 7.4.3.2 Identifikace fenolických látek pomocí HPLC                                | 53 |
| 7.4.3.3 Použitý gradient  | 54 |
| 8 VÝSLEDKY  | 55 |
| 8.1 Základní obsah rutinu ve vybraných rostlinách                                 | 55 |
| 8.1.1 Výsledky experimentů  | 56 |
| 8.1.2 Výsledky z HPLC   | 61 |
| 9 ZÁVĚR   | 66 |
| 10 SEZNAM LITERATURY  | 67 |
| 10.1 Použité obrázky  | 71 |
| 11 PŘÍLOHA  | 72 |

## Abstrakt

Práce se zabývá obsahem rutinu (kvercetin-3-O-rhamnoglukosid) a kvercetinu ve vybraných vzorcích pohanky seté (*Fagopyrum esculentum moench L.*), bezu černého (*Sambucus nigra L.*) a laskavce (*Amaranthus sp.*) a jejich chováním v prostředí žaludku. Tyto vzorky jsou bohaté na obsah flavonoidů, které jsou v dnešní době přijímány velice kladně kvůli jejich antioxidačním účinkům a jejich možné schopnosti prevence civilizačních chorob.

Pro stanovení látek byla použita metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a metoda micelární elektrokinetické kapilární chromatografie (MECC). Obě dvě metody byly použity nezávisle na sobě. Metoda MECC byla použita ke stanovení rutinu a kvercetinu. Nejvyšší obsah rutinu byl zjištěn v listech pohanky seté (*Fagopyrum esculentum moench L.*) (63350 mg/kg) a nejméně u laskavce červenoklasého (*A. hypochondriacus*) (7590 mg/kg).

Metoda HPLC byla použita ke kvantitativnímu stanovení fenolických kyselin. V žádném vzorku nebyl nalezen volný kvercetin.

**Klíčová slova:** Flavonoidy, rutin, volný kvercetin, žaludek, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, micelární elektrokinetická kapilární chromatografie, rod *Amaranthus*, pohanka setá, bez černý.

## Abstract

The work is focused on the content of rutin (quercetin-3-O-rhamnoglucosid) and quercetin in selected samples, buckwheat (*Fagopyrum esculentum Moench L.*), black elderberry (*Sambucus nigra L.*) and amaranth (*Amaranthus sp.*), and their behavior in stomach environment. Samples listed above are rich in flavonoids, which are nowadays very positively accepted due to their antioxidant effects and their potential ability to prevent lifestyle diseases.

High performance liquid chromatography (HPLC) method, and micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC) have been used for the determination of substances. Both methods were used independently. MECC method was used for the determination of rutin and quercetin. The highest content of rutin was found in the leaves of buckwheat (*Fagopyrum esculentum Moench L.*) (63350 mg / kg) and the least in amaranth (*A. hypochondriacus*) (7590 mg / kg).

The HPLC method was used for the quantitative determination of phenolic acids. Free quercetin wasn't found in any samples.

**Keywords:** Flavonoids, rutin, free quercetin, stomach, high performance liquid chromatography, micellar electrokinetic capillary chromatography, genus *Amaranthus*, buckwheat, black elderberr.



## 1 Úvod

Nejnovější výzkumy odkryly v novém světle určité nové informace ohledně účinků flavonoidů na lidský organismus. Ty působí na lidský organismus v pozitivní míře a velice mu vypomáhají při vnitřní ochraně, která je důležitá k deaktivaci radikálů, jež mohou způsobit poškození životně důležitých látek. Těmito látkami jsou bílkoviny, lipidy nebo DNA, s nimiž radikály reagují a ničí je. Tyto látky jsou obsaženy ve značném množství druhů zeleniny i ovoce a podle nových studií se objevují také v červeném víně.

U flavonoidů byl prokázán blahodárny vliv na lidské zdraví, svými antioxidačními účinky zabraňují arterioskleróze, kardiovaskulárním a nádorovým onemocněním.

Pohanka setá (*Fagopyrum esculentum moench L.*), bez černý (*Sambucus nigra L.*) a laskavec (*Amaranthus sp.*) obsahují ve velké míře flavonoidy, které spadají do fenolických sloučenin. Tyto rostliny se mohou používat při průmyslovém zpracování pro získávání těchto fenolických látek, které jsou zdraví prospěšné. Zatím není příliš známo, zda se flavonoidy mění v době, kdy na ně působí prostředí žaludku.

Hlavní místem resorpce polyfenolů v trávicím traktu je tenké a tlusté střevo, ale existují také důkazy, že některé polyfenoly přijímané v nápojích se mohou částečně resorbovat v dutině ústní (Slanina, Táborská, 2004).

Dříve se předpokládalo, že flavonoidy, které jsou převážně přijímány ve formě glykosidů, jsou prakticky neabsorbovatelné a že přes intestinální stěnu mohou proniknout pouze méně polární volné aglykony. Glykosidy flavonoidů se působením mikroorganismů v tlustém střevě štěpí v místě pyronového jádra a vznikají produkty jako fenyloctová a fenypropionová kyselina (Trna, Táborská, 2002).

Toto štěpení v tlustém střevě skutečně probíhá, bylo však zjištěno, že aglykony polyfenolů mohou být uvolňovány z jejich mateřských sloučenin i glykosidasami přítomnými v tenkém střevě (Trna, Táborská, 2002).

Další modifikace resorbovaných polyfenolů cestou konjugačních reakcí probíhá v játrech a případně v ledvinách. Vzhledem k tomu, že část polyfenolů je vylučována žlučí, mohou se tyto již zmetabolizované polyfenoly dále zapojit do přeměn v tenkém střevě a podléhat enterohepatálnímu oběhu (Trna, Táborská, 2002).

Byly zvoleny dvě nezávislé analytické metody. Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a kapilární zónové elektroforézy (CZE). Metoda HPLC se používá

při určování fenolických látek ve velké míře. Je využívána pro její velkou citlivost na organické látky, snadnost a rychlost. Metoda CZE se hojně užívá při separaci organických kyselin a je při separaci účinnější a citlivější než HPLC.

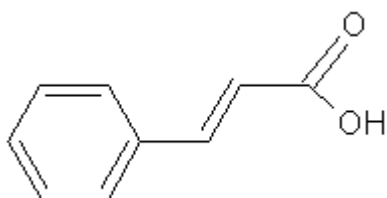
## 2 Teoretická část

### 2.1 Fenolické kyseliny

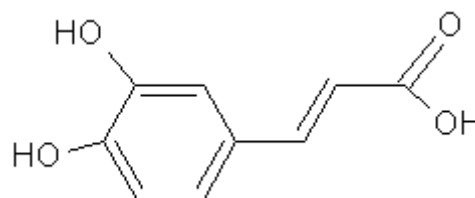
#### 2.1.1 Významné fenolické kyseliny a jejich význam

Fenolické kyseliny jsou přítomné v řadě potravin. Tvoří přibližně jednu třetinu polyfenolů ve stravě. V naší potravě jsou fenolické kyseliny zastoupeny především hydroxyskořicovými kyselinami, převážně ve formě esterů. Nejčastěji je to kávová kyselina a její estery, dále pak ferulová kyselina (Trna, Táborská, 2002).

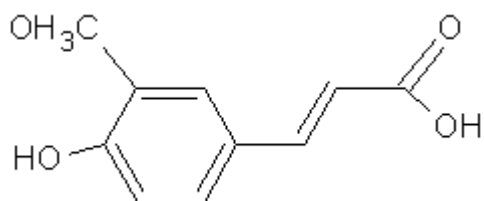
Obr 1: Struktura fenolických kyselin



skořicová kyselina



kávová kyselina



ferulová kyselina

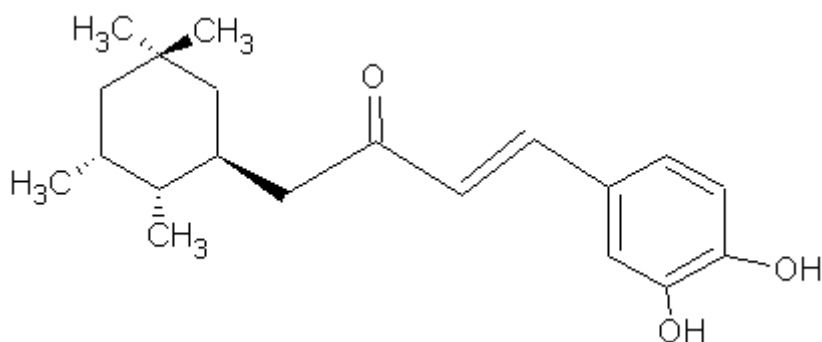
#### 2.1.2 Ferulová kyselina

Ferulová kyselina je spojena s potravinovou vlákninou, v níž je esterovou vazbou vázána k hemicelulose. Jedním z hlavních zdrojů jsou např. pšeničné otruby (5 mg/g) (Trna, Táborská, 2002).

### 2.1.3 Chlorogenová kyselina

Nejběžnějším esterem kávové kyseliny je chlorogenová kyselina (obr. 4), která je v této diplomové práci sledována ve vybraných vzorcích a jejím chováním v prostředí žaludku. Chlorogenová kyselina je přítomna v řadě druhů ovoce a zeleniny a v kávě. Šálek kávy obsahuje 50–150 mg kyseliny chlorogenové. Kromě kávy jsou bohatým zdrojem brambory, jablka, hrušky, meruňky a broskve. Významný obsah kyseliny chlorogenové a jejích derivátů je obsažen v artyčoku (Trna, Táborská, 2002).

Obr 2: Chlorogenová kyselina



### 2.1.4 Vlastnosti fenolických kyselin

Bylo prokázáno, že chlorogenová kyselina brání *Escherichia coli* pomocí kyseliny chlorné před baktericidním účinkem. Kyselina chlorná rychle reaguje s chlorogenovou kyselinou pomocí sdílení jednoho či dvou elektronů při oxidaci produktů prostřednictvím reakce typu peroxidace a fenolázi. Hlavním produktem je o-chinon, který je uvolněn z chlorogenové kyseliny, meziproductem je o-semichinon. Chinonová forma reaguje s kyselinou chlornou za vzniku nestabilních produktů (Kono et al., 1995).

Nitrosaminy, které jsou produkovány dusitany v kyselém prostředí, byly inhibovány pomocí polyfenolů; chlorogenové kyseliny, což je ester kyseliny kávové, a kyseliny chinonové. Kávová kyselina napomáhá inhibici nitrosaminů, ale chinonová kyselina není schopna této inhibice. Kyseliny kávová a chlorogenová jsou schopné vyhledat stabilní volné radikály (Kono et al., 1995).

Chlorogenová kyselina není účinná jen při ochraně, ke které dochází při oxidačním poškození, ale je také schopná zastavit potencionální mutagenní a karcinogenní reakce (Kono et al., 1995).

Chlorogenová kyselina účinně inhibovala železem indukovanou lipidovou peroxidaci v játrech skotu (Kono et al., 1998).

### 2.1.5 Další fenolické deriváty

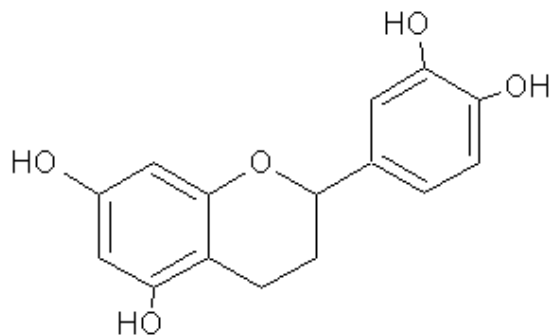
Do této skupiny jsou řazeny kondenzované taniny. Fenolické kyseliny jsou v nich esterifikovány polyhydroxysloučeninami, nejčastěji glukosou. Fenolickými kyselinami jsou jednak kyselina galová v galotaninech (mango), jednak ostatní fenolické kyseliny odvozené oxidací galoylových zbytků v ellagotaninech (borůvky, maliny, rybíz). Vysoké hladiny kondenzovaných taninů obsahuje červené víno (Trna, Táborská, 2002).

## 2.2 Flavonoidy

### 2.2.1 Struktura

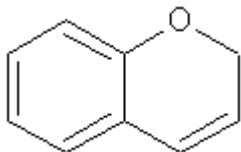
Flavonoidy tvoří rozsáhlou skupinu přírodních látek. Mají dva benzenové kruhy A, B a pyranový kruh C je kondenzován s kruhem A. Jedná se o uspořádání C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (obr. 3) (Trna, Táborská, 2002).

Obr. 3: Vzorec katechinu

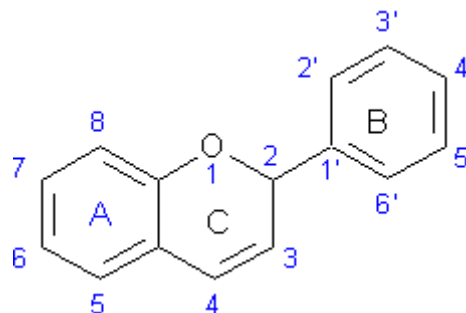


U většiny flavonoidů je  $C_3$  řetězec součástí heterocyklického (pyranového) kruhu. Flavonoidy jsou odvozeny od kyslíkaté heterocyklické sloučeniny *2H*-chromenu, substituovaného v poloze C-2 fenylovou skupinou, který se nazývá flavan (Velíšek, 1999).

Obr. 4: Vzorec *2H*-chromenu



Obr. 5: Vzorec flavanu



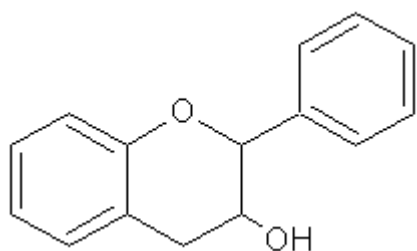
Flavanový skelet se skládá ze dvou benzenových kruhů (A a B) a kruhu odvozeného od *2H*-pyranu (C). Kruh B je spojen s pyranovým kruhem (C) v poloze C-2. Všechny 3 kruhy bývají substituovány hydroxy skupinami (-OH) nebo methoxy skupinami (-OCH<sub>3</sub>) a jednotlivé deriváty se liší pouze stupněm substituce a oxidace. Vyskytují se jako volné látky nebo častěji jako glykosidy. U glykosidů bývá navázaný cukr glukosa, rhamnosa, méně často galaktosa, arabinosa, xylosa, glukonová kyselina a další sacharidy. Obvykle je navázána jedna cukerná jednotka, ale mohou být i dvě, tři či více (Velíšek, 1999).

Další klasifikace flavonoidů je dána stupní oxidace pyranového kruhu ( $C_3$  řetězce) a podle této oxidace rozlišujeme (obr. 6):

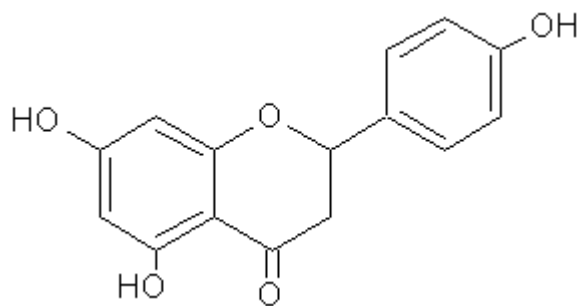
- 1) flavanoly (obr. 6a),
- 2) flavanony (obr. 6b),
- 3) flavony (obr. 6c),
- 4) flavonoly (obr. 6f),
- 5) proanthokyanidiny (obr. 6g),
- 6) kyanidiny (obr. 6d),
- 7) isoflavonoidy (obr. 6e).

Obr. 6: Chemické struktury flavonoidů

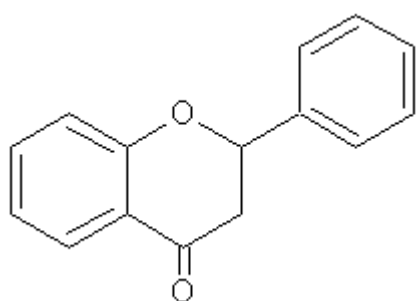
a) Flavanoly



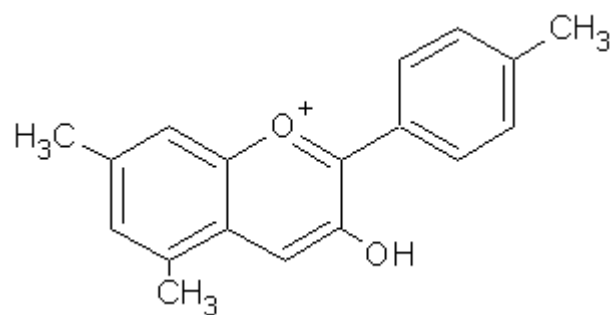
b) Flavanony



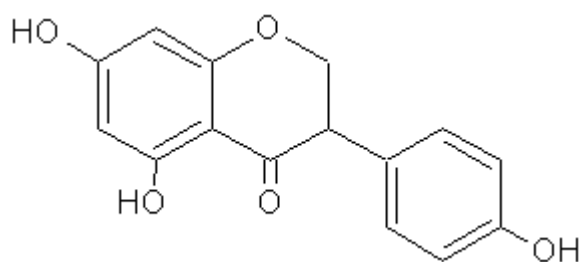
c) Flavony



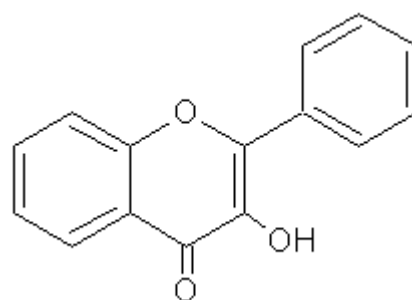
d) Kyanidiny



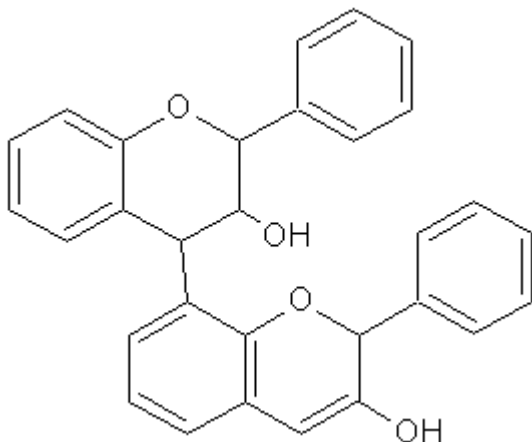
e) Isoflavonoidy



f) Flavonoly



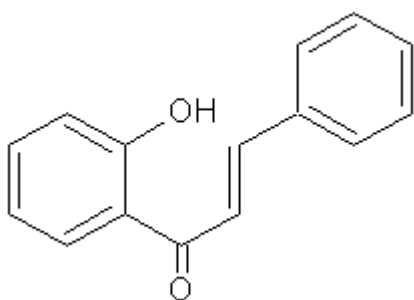
g) Proanthokyanidiny



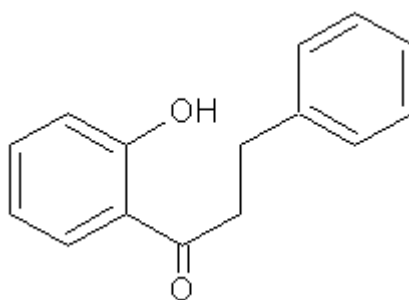
Strukturně příbuzné sloučeniny (vesměs produkty biosyntézy a katabolismu flavonoidů), u kterých jsou kruhy A a B spojeny alifatickým C<sub>3</sub> řetězcem nebo řetězcem, který je částečně součástí furanového cyklu, se dále rozpoznávají chalkony a dihydrochalkony, aurony (Velíšek, 1999).

Obr. 7: Příbuzné sloučeniny flavonoidů

a) Chalkony

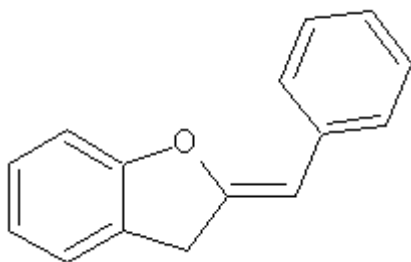


b) dihydrochalkony





c) Aurony

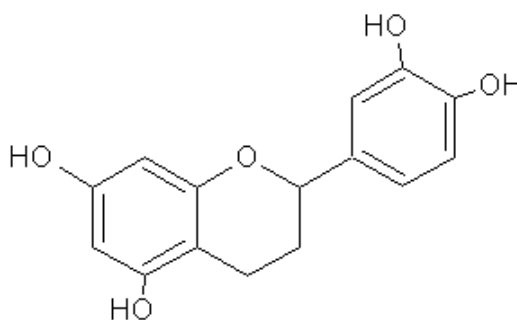


## 2.2.2 Výskyt

### 2.2.2.1 Flavanoly

Hlavními flavanoly jsou katechiny. Patří k nim např. katechin (obr. 8), epikatechin, epigallokatechin a jejich estery s kyselinou galovou. Nacházejí se v čaji. Nálev ze zeleného čaje obsahuje kolem 1g katechinů/l-nápoje. Další zdroje jsou červené víno (270 mg/l) a čokoláda (Trna, Táborská, 2002).

Obr. 8: Vzorec katechinu



#### 2.2.2.1.1 Kvercetin

Flavonol kvercetin (obr. 13) je dominantní flavonoid ve výživě člověka. Kvercetin se nachází ve vysokých koncentracích v běžně přijímaných potravinách jako je cibule (300 mg/kg čerstvé váhy), jablko (21–72 mg/kg), kapusta (100 mg/kg), červené víno (4–16 mg/l) a zelený a černý čaj (10–25 mg/l). V těchto zdrojích se nachází ve formě volné,

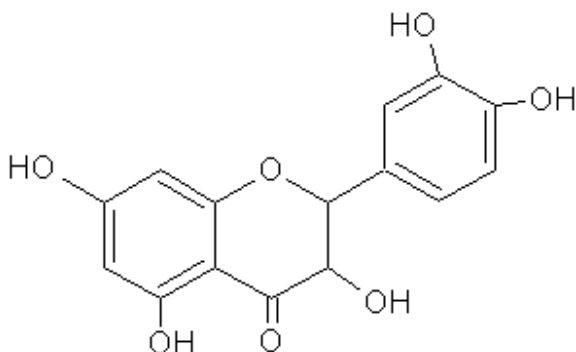
jednak vázán s cukernými jednotkami, např. jako kvercetin-3-O-glukosid, kvercetin-4'-O-glukosid, kvercetin-3-O-rhamnosid (Trna, Táborská, 2002). Rutin (kvercetin-3-O-rhamnoglukosid) je součástí léků používaných jako venofarmaka. Snižuje permeabilitu a fragilitu kapilár (Trna, Táborská, 2002).

Kvercetin je jedním ze skupiny více než 4000 přirozeně se vyskytujících rostlinných fenolických látek, jejichž izolace a biologické identifikace byly nejprve popsány Szent-Györgyi v roce 1936 (Harborne, 1986b).

### 2.2.2.1.1 Vlastnosti kvercetinu

Laboratorní výsledky poukázaly na významně vyšší poškození DNA a také na vyšší množivost či nárůst jadérek (micronucleus) v kostní dřeni myši (de Silva, 2002). Genotoxicita kvercetinu byla vysvětlena jako důsledek vzniku reaktivních forem kyslíku (Sahu a Gray, 1996). Kvercetin a další fenolické sloučeniny podléhají auto-oxidaci, která vede ke vzniku superoxidu, což může vést ke vzniku  $H_2O_2$  (Gaspar et al., 1993) a následnému poškození DNA. Toto poškození DNA bylo zjištěno jen při vysokých dávkách kvercetinu, který není navázán na žádnou jinou látku a jedná se o tzv. volný kvercetin (Anderson et al., 1994).

Obr. 9: Vzorec kvercetinu

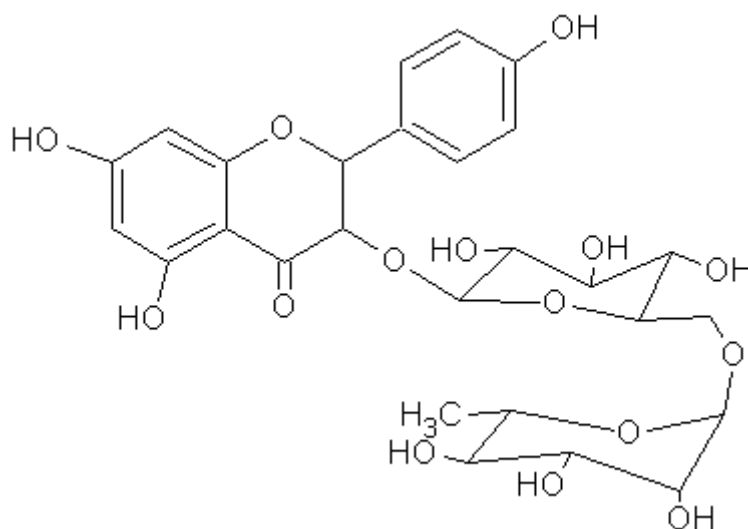


### 2.2.2.1.2 Rutin

Rutin (kvercetin-3-O-rhamnoglukosid) je nejznámějším glykosidem odvozeným od kvercetinu. Ten má pozitivní vliv na pružnost cévních stěn a snižuje jejich křehkost. Proto se rutin používá k léčbě žilných onemocnění. Stejně jako ostatní flavonoidy, rutin má příznivý

účinek na hypertenzi a arteriosklerózu kvůli svým intenzivním antioxidačním schopnostem (Santos et al, 1999). Významná množství rutinu lze nalézt pouze v omezeném množství rostlin např. jerlín japonský (*Sophora japonica L.*), routa vonná (*Ruta graveolens L.*) a kapara trnitá (*Capparis spinosa L.*), ale nejdůležitějším místním zdrojem rutinu je pohanka setá (*Fagopyrum esculentum Moench*) (Lachman et al, 2000). Rutin má další cenné vlastnosti, jako je například zvýšený účinek na imunitní systém, zvýšení pružnosti u cévních stěn, regulace srážení krve a regulace množství cholesterolu v krvi (Si-quan Li, Zhang 2001; Holasova et al 2002) (Dadáková, Kalinová 2010).

Obr. 10: Vzorec rutinu



#### 2.2.2.1.2.1 Vlastnosti rutinu

Při pokusu na myších se testoval rutin v různých dávkách. Bylo prokázáno, že nedošlo k nárůstu jadérek (mikronukleus) v kostní dřeni a ani nedošlo k poškození DNA u daných subjektů. Jen u dávky 2x1250 mg/kg došlo k významně vyššímu poškození. V duchu těchto závěrů se rutin ukazuje jako sloučenina s negativním charakterem vycházející z jeho mutagenity (de Silva, 2002).

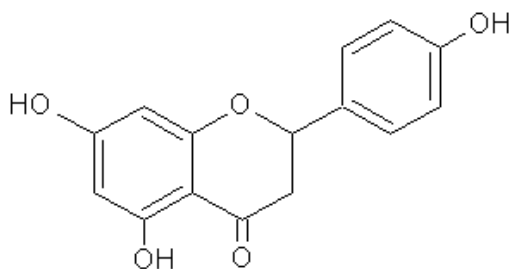
Tento nedostatek mohou eliminovat přírodní flavonoidy, které jsou přítomny v glykosylované formě a které jsou pravděpodobně nepřímo absorbovány (Manach et al., 1995). Jejich absorpce je závislá na působení trávicích glykosidázách. Již dříve bylo

prokázáno, že rutin může být hydrolyzován na svůj aglykon kvercetin v mikroflóře hlodavců (Brown a Dietrich, 1979). Zatím je, ale nejasné v jakém rozsahu je aglykon uvolněn mikrobiálními glykosidázami, aby mohl být absorbován v dolní části střeva před tím, než je dále degradován do nemutagenní aromatické kyseliny a CO<sub>2</sub> (Crebelli et al., 1987).

### 2.2.2.2 Flavanony

Flavanony jsou také nazývány „citrusové“ flavonoidy. Jsou to látky typicky se vyskytující v pomerančích a grapefruitech. K hlavním se řadí naringenin, hesperetin (obr. 14) a jejich glykosidy (Trna, Táborská, 2002).

Obr. 11: Vzorec hesperetinu



### 2.2.2.3 Proantokyanidiny

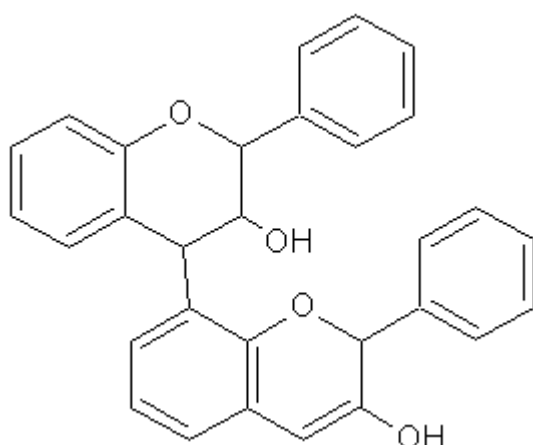
Proantokyanidiny (obr. 12) jsou polymerní flavanoly. Jsou přítomny v rostlinách jako komplexní směsi polymerů s průměrným stupněm polymerace 4-11. Vyskytují se také vázány esterově s kyselinou galovou nebo ve formě dvojité spojených dimerů. Jejich struktura je velmi složitá, přesto ale v poslední době dochází ve výzkumu těchto látek k strmému rozvoji v souvislosti se zdokonalováním separačních a identifikačních metod. Běžným zdrojem jsou jablka, hrušky, hrozny, červené víno, čaj, čokoláda a kakao (Trna, Táborská, 2002).

### 2.2.2.4 Antokyanidiny

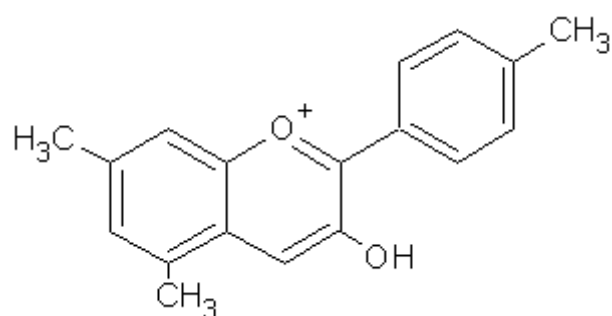
Antokyanidiny jsou červená barviva např. v třešních, švestkách, rybízu. Obsah kolísá v rozmezí 0,15–4,5 mg/g čerstvého ovoce. Průměrný obsah ve vínu se udává 26 mg/l (Trna, Táborská, 2002).

Obr. 12: Vzorce antokyanidinů

a) Proantokyanidin A



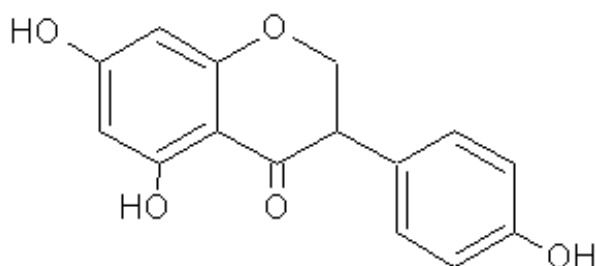
b) Antokyanidin



### 2.2.2.5 Isoflavonoidy

Mezi isoflavonoidy patří především isoflavony daidzein a genistein (obr. 13). Nachází se hlavně v luštěninách, vydatným zdrojem je sója (1–3mg/g) a veškeré produkty z ní. Průměrný příjem v Japonsku je 30–40 mg/den, zatímco v Evropě jen 1–9 mg/den (Trna, Táborská, 2002).

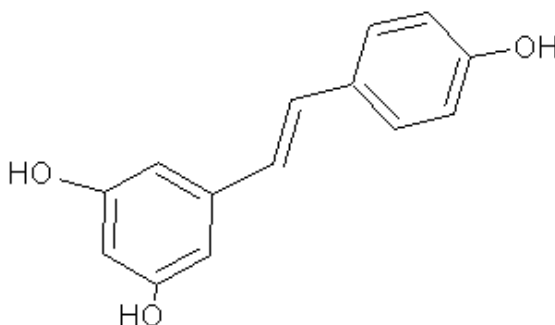
Obr. 13: Vzorec genisteinu



### 2.2.2.6 Stilbeny

Tato zvláštní skupina polyfenolů by měla být zmíněna zvláště kvůli tzv. Francouzskému paradoxu, který je vysvětlen dále. V rostlinné říši nemají stilbeny takové zastoupení, ale jeden z nich se stal přesto velice zajímavým a to resveratrol. V jedné oblasti ve Francii byl zjištěn nízký výskyt kardiovaskulárních onemocnění a tato skutečnost byla vysvětlena zvýšenou konzumací červeného vína, za jehož účinnou složku byl považován resveratrol. Vzhledem k tomu, že koncentrace resveratrolu ve většině vín je podstatně nižší ve srovnání s ostatními polyfenoly, zdá se být jeho příspěvek k antioxidačním vlastnostem červeného vína nevýznamný. Je mu však věnována pozornost kvůli možným antikancerogenním účinkům (Trna, Táborská, 2002).

Obr. 14: Vzorec resveratrolu



### 2.2.2.7 Výskyt polyfenolů v určitých typech potravin

Tabulka 1: Orientační obsah polyfenolů v běžně konzumovaném množství některých potravin a nápojů.

| Potravina             | Množství potravin | Obsah  | Polyfenolů                    | Hlavní polyfenoly |
|-----------------------|-------------------|--------|-------------------------------|-------------------|
|                       |                   | HPLC   | Folinovo činidlo <sup>a</sup> |                   |
| <b>Brambory</b>       | 200 g             | 30 mg  | 60 mg                         | chlorogenová k.   |
| <b>Rajčata</b>        | 100 g             | 10 mg  | 40 mg                         | fenolova k.       |
| <b>Jablka</b>         | 200 g             | 240 mg | 460 mg                        | proantokyanidiny  |
| <b>Višně</b>          | 50 g              | 280 mg | 280 mg <sup>b</sup>           | antokyanidiny     |
| <b>Pšeničná mouka</b> | 100 g             | 75 mg  | 75 mg <sup>b</sup>            | ferulova k.       |
| <b>Hořká čokoláda</b> | 20 g              | 100 mg | 170 mg                        | proantokyanidiny  |
| <b>Červené víno</b>   | 100 ml            | 100 mg | 200 mg                        | proantokyanidiny  |
| <b>Káva</b>           | 200 ml            | 150 mg | 180 mg                        | chlorogenova k.   |
| <b>Černý čaj</b>      | 200 ml            | 140 mg | 200 mg                        | katechiny         |

<sup>a</sup> Stanoveno spektrofotometricky pomocí Folinova činidla na základě redukčních vlastností polyfenolů. Obsahy polyfenolů jsou nadhodnoceny u vzorků obsahujících askorbovou kyselinu, případně jiné redukující látky, např. siřičitany (víno).

<sup>b</sup> Hodnoty stanovené pomocí Folinova činidla chybí, proto jsou nahrazeny hodnotami získanými pomocí HPLC (Slanina, Táborská, 2004).

### 2.2.3 Vlastnosti

Flavonoidy jsou polyfenolické sloučeniny, které nemohou být syntetizovány v živočišném organismu. Nicméně jsou široce rozšířeny v rostlinách jako ochranné látky proti škodlivým vnějším vlivům (Volf, Andrs, 2008).

Zvířata a lidé nejsou schopni syntetizovat aromatické sloučeniny s benzenovými cykly z alifatických prekurzorů. Z tohoto důvodu jsou závislí na exogenní stravě a příjmu z rostlin, které je obsahují (Volf, Andrs, 2008).

V anglosaské literatuře jsou flavonoidy známé jako přírodní látky, které se vyskytují v potravě, a člověk je nedokáže syntetizovat, ačkoli můžou být podle definice zařazeny do skupin vitamínů (Linder, 1991). Z mnoha polyfenolických látek je pouze jedna látka v současné době přijímána jako vitamín, a to vitamín E. V německé literatuře se flavonoidy označují jako sekundární rostlinné látky (Häsing et al, 1999).

Hlavní známé účinky flavonoidů:

- 1) inhibice peroxidace lipidů (LPO)
- 2) čištění od kyslíkových radikálů
- 3) vázání a inaktivace pro-oxidačních kovů jako Fe a Cu

Nejčastěji se vyskytující přírodní flavonoidy mají většinou antialergické, protizánětlivé, protivirové, vazodilatační a antioxidační účinky (Puodziunene et al, 2009).

Antioxidační účinek ovlivňuje tvorbu radikálů i nepřímo aktivaci nebo deaktivaci antioxidačních enzymů podílejících se na vzniku různých radikálů. Jejich antioxidační aktivita vychází ze schopnosti vytvářet chelátové vazby s železem a s jinými redox-aktivními a elektron-přechodnými kovy, kvůli velkému množství hydroxylových skupin (-OH) v jejich molekule (Puodziunene et al, 2009).

Protizánětlivá aktivita je způsobena schopností inhibovat tvorbu mediátorů zánětů prostaglandinů a leukotrienů (Puodziunene et al, 2009).

Podílejí se na aktivaci několika typů buněk, a to basofilů, neutrofilů, eosinofilů, T- a B- lymfocytů, makrofágů atd. (Puodziunene et al, 2009).

Flavonoidy jsou také známé svými močopudnými vlastnostmi. Močopudný efekt byl pozorován u kvercetinu, kempferolu, morinu, rutinu aj. (Puodziunene et al, 2009).

Zároveň působí na různé transdukční, signální cesty v buňce a ovlivňují tak např. extracelulární signál regulující kinázy nebo jiné transkripční faktory. Je známo



i fyziologické působení flavonoidů, jejich ovlivňování kardiovaskulárních chorob nebo nádorů, či jejich vliv na neurologické nemoci (Hertog et al. 1995).

Červené víno je považováno za účinný zdroj flavonoidů. Jeho pravidelné užívání v malých dávkách by mohlo snížit kardiovaskulární choroby až o 40 % díky jeho antioxidačním vlastnostem (Hertog et al. 1995).

Flavonoidy, např. extrakt ginkgo biloby, se rovněž mohou podílet na léčbě nebo prevenci různých neurodegenerativních onemocnění (Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba, Huntingtonova choroba aj.) ve smyslu neuroprotektivní ochrany. To je dáno jejich konvenčními antioxidačními schopnostmi, tj. schopností reagovat přednostně s oxidačními činidly nebo ovlivněním např. signální kaskády buňky, ovlivněním exprese genu a potlačení cest vedoucích k zániku neuronů (Volf, Andrs, 2008).

Převládá názor, že flavonoidy jsou netoxické, absorbovatelné a biologicky aktivní v živém organismu, zabraňují šíření volných radikálů, které jsou škodlivé pro buňky a LPO a které přímo souvisí se stárnutím buněk a chronickými onemocněními, jako je arterioskleróza (Cook, Samman. 1996).

## 2.3 Distribuce a funkce flavonoidů v rostlinách

V cévnatých rostlinách bylo identifikováno přes 4000 druhů flavonoidů. Toto číslo u různých druhů kolísá v důsledku růstových změn, zralosti rostliny a v závislosti na dalších podmínkách. V souvislosti s obsahem flavonoidů byl prozkoumán zatím jen malý počet rostlin. Proto není jasné, jaké množství flavonoidů je konzumováno člověkem. Flavonoidy byly produkovány rostlinami, které se tak vyvinuly, aby se chránily před houbovými parazity, býložravci, patogeny a oxidačním buněčným zraněním. Flavonoidy však následně začaly být zdrojem podnětů napomáhajících opylování a začaly fungovat jako atraktanty hmyzu, které jej přivádějí ke zdrojům potravy. Jako příklad můžeme uvést antokyany produkující růžové, červené, fialové a modré barvy květin, plodů a zeleniny (Cook, Samman, 1996).

## 3 Zkoumané vzorky a jejich charakteristika

### 3.1 Rod Laskavec (*Amaranthus Sp.*) – čeled': laskavcovité (*Amaranthaceae*)

#### 3.1.1 Charakteristika druhu

Jsou většinou jednoleté byliny s více kambiálními kruhy ve stonku; listy jsou jednoduché, řapíkaté, často srstnaté. Květy jsou drobné, oboupohlavné nebo jednopohlavné, anemofilní; okvětí je suchomázdřité, zpravidla pětičetné (redukovaný květ), se stejným počtem tyčinek jako okvětních plátků. Plod je blanitá tobolka nebo nažka. V složitých bohatých latovitých květenstvích jsou štětinovité, někdy nápadně zbarvené listeny. Metabolismus laskavcovitých je nesespecializovaný. K laskavcovitým patří mnoho druhů ruderálních, kosmopoliticky rozšířených. Laskavcovité jsou rozšířeny hlavně v tropech. U nás rostou na rumišťích a jako polní plevely, hlavně v teplejších oblastech. Některé cizí se pěstují jako okrasné (Vančurová et al, 1966).

#### 3.1.2 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).

### 3.1.3 Druhy

#### 3.1.3.1 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).

#### 3.1.3.2 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).

Obr. 15: Laskavec (*Amaranthus*)



## **3.2 Pohanka setá (*Fagopyrum esculentum moench*) – čeled': Rdesnovité (*Polygonaceae*)**

### **3.2.1 Charakteristika**

Je jednoletá bylina až 70 cm vysoká, šťavnatá, s větvenými načervenalými lodyhami a srdčité hrálovitými až střelovitými listy. Květy v chocholičnatých latách vyrůstají v úžlabí listů. Květy jsou narůžovělé nebo bílé, řidčeji červené; mají jednoduché petičetné okvětí a 8 tyčinek střídajících se s medníky. Pestík má 3 hlavičkovité blizny, plod je trojboká nažka, zpravidla tmavohnědá, s hladkými hranami (Vančurová et al, 1966).

Květy mají zajímavou stavbu: počet tyčinek neodpovídá počtu okvětních lístků. V květech je patrná heterostylie a bylo zjištěno, že blizny krátkočnělečných květů jsou oplozeny pylem květů dlouhočnělečných a opačně. Při opylení z květu téhož typu vzniká méně plodů; ještě nižší plodnost je při opylení pylem z vlastního květu (Vančurová et al, 1966).

### **3.2.2 Využití**

Pohanka se pěstuje jako píceňina i jako obilnina; semena se zpracovávají na kroupy a krupici. Mouka z pohanky se používá při výrobě čokolády. Jako píceňina má dobrou výživovou hodnotu, ale je-li zkrmována výhradně (bez příměsí), zvláště v době květu, může způsobit onemocnění zvané fagopyrismus (Vančurová et al, 1966).

Pohanka má krátkou vegetační dobu (10–12 týdnů), a proto ji lze pěstovat i ve vyšších polohách; v teplejších polohách se pěstuje jako strnisková plodina po obilí nebo řepce. Roste i na chudých půdách, na písčitéch lépe než na vápencovitých a slínovitých. Lze ji pěstovat i na rašelinných půdách. Jako píceňina se sklízí buď na zeleno, nebo až v době zralosti. Za zelena v době květu má krmnou hodnotu stejnou jako kukuřice. Pohanka je také kvalitní medonosná rostlina. U nás se v současné době málo pěstuje, ač dříve bylo pěstování běžné (Vančurová et al, 1966).

Obr. 16: Pohanka setá (*Fagopyrum esculentum moench*)



### 3.3 Bez černý (*Sambucus nigra L.*) – čeled': Bezovité (*Sambucaceae*)

#### 3.3.1 Charakteristika

Je statný keř se silnými hranatými větvemi s tlustou dřevní tzv. bezovou duší, s nápadnými lenticelami v kůře. Květenství jsou bohatá, složená z několika ramenných vrcholíků, plody černé peckovice. Celá rostlina charakteristicky páchne, obsahuje koniin. Květy a plody se používají v lékařství, plody též k aromatizování octa. Bez černý roste na lesních okrajích a na pasekách jako buřeň, v lužních hájích a kolem lidských obydlí, kde je pěstován nebo se samovolně rozšiřuje. V zahradnické kultuře se uplatňují vzrůstové a listové formy. Má lichozpeřené listy. V pletivu se nacházejí nádržky se silicemi (Vančurová et al, 1966).

#### 3.3.2 Využití

Jako léčivá část se používá květenství. Obsahuje velké množství rutinu a chlorogenové kyseliny. Rutin působí příznivě na stěnu žil a vlásečnic a zvyšuje jejich odolnost vůči lámavosti. U chlorogenové kyseliny byla objevena výrazná protinádorová aktivita a výrazné antioxidační účinky (Randuška et al., 1983). Bez černý je oblíbenou a tradiční léčivkou zařazenou do Českého lékopisu (Český lékopis, 1997).

Obr. 17: Bez černý (*Sambucus nigra* L.)



## 4 Fyziologie trávení a vstřebávání

Příjem potravy ze zevního prostředí je nezbytný pro udržování životních funkcí. Zevní prostředí je zdrojem minerálních látek, živin a dalších látek a je také místem, kam jsou odstraňovány produkty metabolismu. Orgány, které se podílejí na přípravě potravy k přenesení (vstřebávání) do krve, lymfy a na vlastním vstřebávání, jsou součástí trávicího ústrojí. Trávicí systém je ve velmi zjednodušené představě trubicí procházející tělem, tedy traktem. Je rozdělen na určité prostory, jimiž musí potrava projít, a zbytky jsou vyloučeny mimo tělo. Tyto prostory lze pro zjednodušení dělit na tři části (Kittnar et al, 2011):

- 1) horní (ústa, jícen, žaludek) gastrointestinální trakt (GIT),
- 2) střední (tenké střevo) GIT,
- 3) dolní (tlusté střevo) GIT.
- 4) Jako čtvrtá část jsou uváděny akcesorní orgány podílející se na funkci GIT, ale leží mimo vlastní trávicí trubici – slinné žlázy, játra a slinivka břišní.

### 4.1 GIT (gastrointestinální trakt)

GIT má tyto hlavní úkoly:

- 1) mechanické a chemické zpracování potravy – trávení
- 2) přestup selektovaných látek stěnou GIT – vstřebávání
- 3) vyrovnávání nárazovitého příjmu potravy – skladování
- 4) vlastní imunitní systém a trávení likvidují mikroorganismy a rozrušuje se antigenní struktura látek – ochrana
- 5) při zpracování a vstřebávání potravy uvolňuje endokrinně aktivní látky

Pro účel mé diplomové práce se budeme zajímat jen o horní část (ústa, jícen, žaludek) GIT (Kittnar et al, 2011).

V horních částech GIT (ústa a žaludek) se potrava mechanicky rozmělnuje a rozpouštějí se zde některé její součásti. Enzymatické štěpení potravy by mohlo začínat již



v ústech, sousta v nich však jsou obvykle velmi krátce, a proto největší část chemického štěpení škrobů  $\alpha$ -amylasou slin proběhne až v žaludku. Po promísení se žaludečním obsahem zde působí silná kyselina chlorovodíková, která ukončí štěpení škrobů (pH až okolo 1) a rozbíhá se intenzivní enzymatický rozklad bílkovin pepsinem, pokračující v tenkém střevě skladbou jiných enzymů (Kittnar et al, 2011).

Činnost GIT je řízena nervově (parasympatikem), humorálně (hlavně hormony produkované v trávicím traktu) a přímým mechanickým a chemickým působením obsahu (Kittnar et al, 2011).

## 4.2 Trávení v ústech

Ústa jsou místem, kde se potrava dostává do prvního kontaktu s trávicím traktem. Probíhá zde hrubé mechanické zpracování (žvýkání) a zároveň je chutí, čichem a dotykem získávána informace o jejich kvalitách. Tato informace na jedné straně slouží pro přípravu dalších částí trávicího systému na příjem a další zpracování přijatých látek a na straně druhé může zabránit polknutí a spustit i ochranné mechanismy včetně zvracení (Kittnar et al, 2011).

Mechanické zpracování potravy spočívá v jejím rozmělnění pomocí zubů a jazyka a tvorbě soust, která jsou obalována do ochranné vrstvy mucinu. Potrava se zde částečně rozpouští ve slinách a začíná vyrovnávání její teploty s teplotou těla (Kittnar et al, 2011).

## 4.3 Sliny

Sliny jsou produktem tří párů velkých slinných žláz a množství drobných žlázek rozestých po celých ústech. Jsou významné pro správnou funkci dutiny ústní, jícnu a žaludku. Jejich sekrece je stálá (bazální sekrece: cca 0,7 ml/min); může však výrazně stoupnout (vyvolaná sekrece: maximálně 4-7 ml/min). Při nedostatku vody tvorba slin klesá a vysychají ústa a hltan. To přispívá k pocitu žízně. Žízeň je důležitým signálem, který spouští chování zajišťující rovnovážnou bilanci tekutin v těle – pití (Kittnar et al, 2011).

Průměrně se tvoří do 2 litrů slin za den. Jejich pH je přibližně neutrální. V porovnání s plazmou mají sliny nižší osmotický tlak – jsou hypotonické. Obsahují cca 99,4 % vody, organické látky (mucin,  $\alpha$ -amylasu, lysozym, imunoglobulin A) a anorganické látky ( $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , fosfáty, malá množství dalších látek). Sliny vylučované při bazální

sekreci mají vyšší obsah draslíku a fosforu a jsou vůči plazmě hypotonické (Kittnar et al, 2011).

- a) mechanismus sekreční, je unavitelný (delší než 20–40 min. vede ke snižování obsahu bílkovin, později fosforu a nakonec i draslíku a složení slin se pak blíží složení plazmy)
- b) mechanismus filtrační je neunavitelný, využívá prokrvení žláz.

#### **4.3.1 Slinné žlázy:**

- 1) Žlázy podjazykové vyměšují slinu vazkou, bohatou na mucin – označovány jako žlázy mucinózní.
- 2) V příušních žlázách se tvoří sliny řídké – serózní s větším obsahem enzymu  $\alpha$ -amylasy, který štěpí škroby, dokud není inaktivován kyselým žaludečním obsahem.
- 3) Podčelistní žlázy jsou smíšené – seromuciozní.
- 4) Sekret malých žlázek obsahuje hlavně mucin.

#### **4.4 Jícen**

Při manometrickém měření tlaku v jednotlivých částech jícnu v klidu, bylo zjištěno, že na jeho počátku a konci je vyšší tlak než ve zbývající části, kde se blíží nule. Místa vyššího tlaku odpovídají anatomické lokalizaci horního esofageálního svěrače (HES) a dolního esofageálního svěrače (DES). HES je tvořen převážně zesílením příčně pruhované svaloviny a DES je tvořen hladkou svalovinou a není anatomicky lokalizovaný (Kittnar et al, 2011).

#### **4.5 Žaludek**

Žaludek je vakovitý orgán, kde je potrava skladována, mechanicky zpracována a trávena; vstřebávání je minimální. Vstup do žaludku je ovládán DES a také anatomickým uspořádáním jeho kardiální oblasti (Kittnar et al, 2011).

Sliznice je kryta cylindrickým epitelem s četnými charakteristickými buňkami produkující mucin (Kittnar et al, 2011).

### 4.5.1 Sliznice žaludku:

- 1) Tubulární žlázy – tam, kde vystupují, se povrchový epitel sliznice mění na tzv. buňky krčku s menším obsahem mucinu (sekretují směs mukoproteinů,  $\text{HCO}_3^-$  a jeden typ pepsinogenů).
- 2) V samotných tubulárních žlázách jsou buňky parietální (eozinofilní; produkce HCl) a hlavní (produkující pepsinogen).

### 4.5.2 Žaludeční sekrece

Žaludek vytvoří v tubulárních žlázách sliznice za den 2–3 litry šťávy s nízkým pH, proteolytickými enzymy a mucin. Součástí žaludeční šťávy jsou produkovány různými buňkami. Pro změnu sekrece je hlavním signálem složení žaludečního obsahu. Jsou-li v trávenině bílkoviny ve větším množství, uvolní žaludek gastrin a ten zhruba úměrné množství přítomného proteinu zvýší produkci HCl. Cukry a tuky pH žaludku nemění (Kittnar et al, 2011).

V poměrně malé kardiální části žaludku jsou bohatě větvené tubulární žlázy. Fundus a tělo představují  $\frac{3}{4}$  žaludku. Jsou zde jen lehce stočené žlázy, ve kterých jsou mucinózní buňky produkující mucin, buňky hlavní (pepsinogeny) a buňky parietální (krycí), tvořící HCl. Pylorická oblast (15–20 % žaludku) obsahuje jednoduché tubulární žlázy tvořící hlavně hlen. Jsou zde i buňky G tvořící gastrin. Ve sliznici všech tří oblastí jsou mucinózní buňky, sekretní směs mukoproteinů,  $\text{HCO}_3^-$  a jeden typ pepsinogenu (Kittnar et al, 2011).

### 4.5.3 Tvorba a sekrece HCl

Rychlost sekrece ovlivňuje iontové složení žaludečních šťáv. Čím je vyšší, tím vyšší je obsah  $\text{H}^+$ , při nižší rychlosti jej nahrazuje  $\text{Na}^+$ . Koncentrace  $\text{K}^+$  je zde vždy vyšší než v plazmě. Hlavním aniontem je zde  $\text{Cl}^-$ . Při vysokých rychlostech se šťáva podobá izotonickému roztoku HCl a při nízkých rychlostech je spíše hypotonická. Při bazální sekreci je tvořeno 2 mmol HCl/h., při maximální 50 mmol HCl/h. Kofein a aminokyseliny pravděpodobně působí na G- nebo parietální buňky a zvyšují sekreci HCl i v období, kdy je zpětně vazebně tlumen nízkým pH (Kittnar et al, 2011).

### 4.5.3.1 Kyselina chlorovodíková:

- 1) je tvořena parietálními buňkami,
- 2) konvertuje pepsinogeny na pepsin a tím je aktivuje,
- 3) zajišťuje kyselé pH, které je optimální pro činnost pepsinů,
- 4) zajišťuje kyselé pH, které chrání některé vitamíny (např. C),
- 5) zabíjí většinu spolykaných bakterií,
- 6) převádí těžko rozpustný  $\text{CaCO}_3$  na rozpustný  $\text{CaCl}_2$ ,
- 7) pomáhá redukci  $\text{Fe}^{3+}$  na vstřebatelný  $\text{Fe}^{2+}$ , kterou udržuje v roztoku,
- 8) koaguluje bílkoviny (porušení jejich prostorového uspořádání), což usnadňuje jejich enzymatický rozklad.

### 4.5.4 Pepsiny

Pepsiny jsou endopeptidázy tvořené a vylučované hlavními buňkami v podobě směsi neaktivních proenzymů – pepsinogenů. Pepsinogeny se v kyselém prostředí autokatalyticky přeměňují na pepsiny. Optimální pH pro jejich funkci se pohybuje mezi 1,8–3,5. Pokud pH stoupne nad 5, jejich proteolytická aktivita rychle klesá, a je-li pH dokonce zásadité, jsou dokonce ireverzibilně inaktivovány. Pepsiny mohou rozložit přibližně 20 % proteinů běžné potravy (Kittnar et al, 2011).

### 4.5.5 Hlen

Viskózní a lepkavé sekrety obsahující glykoprotein mucin jsou souhrnně označovány jako hlen. Vazký hlen vytváří nad povrchem sliznice vrstvu asi 0,6 mm silnou, která chrání sliznici před mechanickými a chemickými účinky žaludečního obsahu (Kittnar et al, 2011).

## 5 Analytické metody

Pro analýzu flavonoidů se nejčastěji používá kapilární zónová elektroforéza (CZE) či vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), které dokážou provést separaci podobných sloučenin.

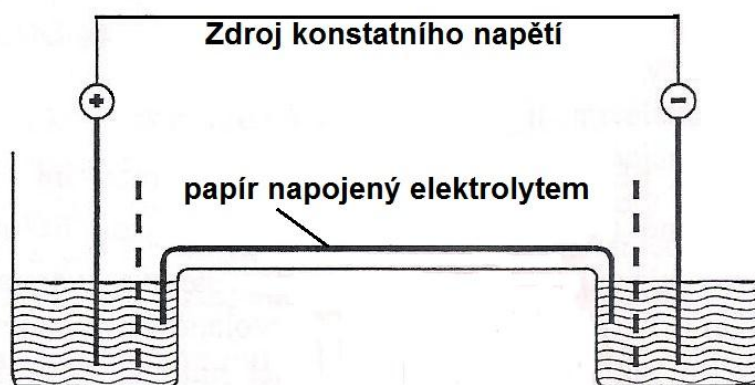
Flavonoidy jsou skupinou mnoha látek a lze říci, že v přírodních materiálech se budou vyskytovat v různých směsích. Stanovení všech jednotlivých složek by bylo velice obtížné. Naproti tomu flavonoidy obsahují jen několik typů aglykonů. Nejvíce rozšířen je kvercetin. Nejlepší metodou je převedení glykosidů na aglykony kyselou hydrolyzou. Poté je možné izolovat aglykony z roztoku metodou SPE na kolonci s náplní RP-18 a jejich následnou eluci čistým methanolem. Množství aglykonů vyjadřuje celkový obsah této látky ve všech formách výskytu v daném materiálu (Dadáková et al, 2001).

### 5.1 Elektroforéza

Zařízení pro klasickou elektroforézu se skládá ze dvou elektrod umístěných do rezervoárů elektrolytu (obvykle tlumivého roztoku). Oba rezervoáry jsou vodivě spojeny vhodným médiem napuštěným elektrolytem. Celý systém je uzavřen ve schránce, aby nedocházelo k odparu roztoku elektrolytu z porézního média (Drbal a Křížek, 1999).

Volba elektrolytu i porézního média závisí na charakteru separovaných látek. Jako médium se používá speciální filtrační papír napojený elektrolytem nebo skleněná deska s vrstvou celulosy či gelu. Vodivé spojení mezi katodou a anodou zajišťuje konstantní intenzitu elektrického pole v celém systému. Schéma zařízení pro elektroforézu je uvedeno na obr. č. 18 (Drbal a Křížek, 1999).

Obr. 18: zařízení pro elektroforézu



Do středu papíru či gelu se dávkuje malé množství vzorku ve formě tečky či čárky kolmé na směr pohybu iontů. Na svorky se připojuje napětí obvykle velikosti stovek voltů. Kationty a anionty se dají do pohybu opačnými směry různou rychlostí a rozdělí se na oddělené skvrny či zóny. Detekce se provádí obdobně jako v TLC chromatografii (Drbal a Křížek, 1999).

### 5.1.1 Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

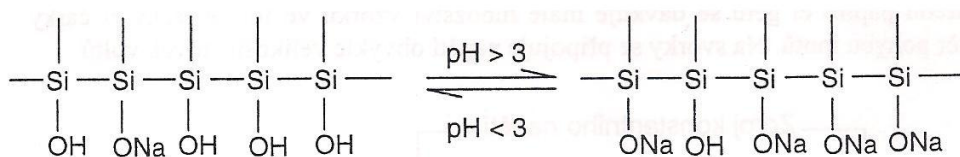
Při kapilární zónové elektroforéze jsou rezervoáry s tlumivým roztokem propojeny kapilárou vyplněnou rovněž tlumivým roztokem. Fakt, že separace probíhá v uzavřené tenké kapiláře, uděluje elektroforéze v tomto provedení kvalitativně zcela nové vlastnosti. V kapilární zónové elektroforéze lze používat stejné kapiláry s jakými pracuje kapilární plynová chromatografie. Běžné kapiláry mají vnitřní průměr 25–75  $\mu\text{m}$  a jejich povrch není nijak upravován. Kapiláry jsou vyrobeny ze syntetického křemene a před mechanickým poškozením jsou chráněny polyiminovým pokryvem (Drbal a Křížek, 1999).

### 5.1.2 Specifika kapilární zónové elektroforézy

Hlavní výhodou elektroforézy v kapilárním provedení je možnost zvyšovat svorkové napětí přístroje až k hodnotám 30 kV. 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. V kapilární zónové elektroforéze je však i při těchto hodnotách vloženého napětí generované teplo odvedeno stěnou kapiláry do okolního termostatovaného prostoru (Drbal a Křížek, 1999).

Další významnou vlastností křemenných kapilár je existence elektroosmotického toku kapaliny (pufry) kapilárou. Vnitřní kapilární povrch se chová jako slabě zásaditý katex (Drbal a Křížek, 1999).

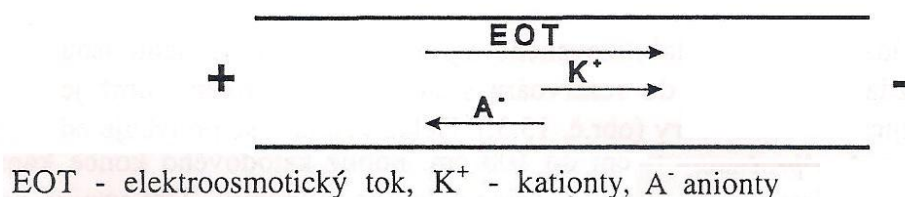
Obr 19: Vnitřní kapilární povrch



Při  $\text{pH} > 2$  dochází k růstu pH k stále významnějšímu nahrazování  $\text{H}^+$  iontů na vnitřní kapilárním povrchu za jiné (nejčastěji  $\text{Na}^+$ ) ionty, které jsou běžnou složkou tlumivého roztoku. Kationty  $\text{Na}^+$  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  $\text{pH} = 2$  téměř nulový, s vzrůstem pH se zvyšuje. Regulace elektroosmotického toku je jedním z důležitých klíčů k úspěšné separaci (Drbal a Křížek, 1999).

V běžných elektroforetických systémech je ve srovnání s rychlostí běžných iontů rychlost elektroosmotického toku dominantní. Jak kationty, tak anionty jsou tedy během analýzy unášeny ke katodě, neboť výsledná rychlost pohybu aniontů i kationtů je dána vektorovým součtem jejich migračních rychlostí a rychlostí pohybu elektroosmotického toku obr. č. 20 (Drbal a Křížek, 1999).

Obr. 20: Migrační poměry v kapiláře



### 5.1.3 Separace metodou kapilární zónové elektroforézy

Do kapiláry je na jejím anodovém konci zaveden vzorek. Oba konce kapiláry jsou ponořeny do vhodného tlumivého roztoku a při 10–30 kV dochází v kapiláře k elektroosmotickému toku, kterým jsou jak kationty, tak anionty transportovány směrem k detektoru. Během této cesty však dochází k jejich vzájemné separaci. O kvalitě dělení rozhoduje zejména délka kapiláry, rychlost elektroosmotického toku, pohyblivost dělených iontů, jež je u protolytů závislá na pH roztoku a teplotě, při níž separace probíhá (Drbal a Křížek, 1999).

### 5.1.4 Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MECC)

Používá se k separaci elektroneutrálních látek. Při MECC se rozpustí v tlumivém roztoku povrchově aktivní látky v tzv. nadkritické koncentraci. Při této koncentraci dochází v roztoku k tvorbě micel. Nenabitě organické látky mohou interagovat s micelami. Zejména polarita vazby rozhodne, jak dlouho se bude příslušná složka vzorku v hydrofobním jádře micely zdržovat. K separaci tedy dochází díky nesterénní četnosti a míře interakce dělených elektroneutrálních látek se systémem micel v tlumivém roztoku (Drbal a Křížek, 1999).

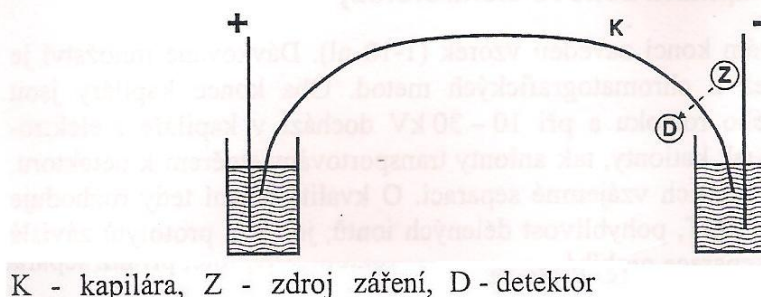
### 5.1.5 Přístroje pro kapilární zónovou elektroforézu

Analyzátor pro CZE se skládá ze zdroje stabilizovaného vysokého napětí. Z něho jsou vyvedeny dvě elektrody, každá je umístěna do rezervoáru s tlumivým roztokem, jímž je



vyplněna i kapilára přemostující oba rezervoáry (obr. 21). Délka kapiláry se pohybuje od 15 cm do 100 cm. Poblíž katodového konce kapiláry je odstraněn její vnější polyimínový povrch v délce několika milimetrů. Tím vzniká na kapiláře okénko, kterým příčně prochází ultrafialové či viditelné záření ze zdroje kapilárou do detektoru (Drbal a Křížek, 1999).

Obr. 21: Schéma kapilární zónové elektroforézy



### 5.1.6 Využití kapilární elektroforézy

Metoda CZE nachází uplatnění při separacích organických kyselin, aminokyselin, aminů, cukrů, alkoholů, fenolů, vitamínů, drog a mnohých dalších, zvláště organických látek (Drbal a Křížek, 1999).

Stanovení volného kvercetinu a glykosidů odvozených od kvercetinu v květu, listech, lodyze a nažkách v případě pohanky bylo analyticky stanoveno metodou MECC. Největší obsah rutinu byl objeven u obou typů pohanky: 99 400 mg/kg u pohanky obecné (*Fagopyrum esculentum*), 108 000 mg/kg u pohanky tatarcky (*Fagopyrum tataricum*). Volný kvercetin se vyskytuje v květech a nažkách pohanky obecné (*Fagopyrum esculentum*), zatímco květy a nažky pohanky tatarcky (*Fagopyrum tataricum*) obsahovaly kvercetin (Dadáková, Kalinová, 2010).

Bylo prokázáno, že flavonoidy rutin a kvercetin hrají svou roli při účincích škodlivých volných radikálů u cirhotických myší. Pro pokus, který pojednává o změně jejich DNA a tudíž o škodlivosti rutinu a kvercetinu v organismu, byly zvoleny tyto dávky pro obě dvě sloučeniny: 2 x 2500 mg/kg, 2 x 1250 mg/kg a 2 x 625mg/kg (da Silva et al, 2002). K ověření byla použita laboratorní technika „DNA comets“ (zvaná též „single cell gell assay“ – SCG), což je relativně jednoduchá metoda sledování poškození DNA s mnohočetnými aplikacemi, jejíž podstatou je elektroforéza DNA lyzovaných buněk v tenké vrstvě agarózového gelu.

Výhodou je relativní rychlost metody, snadný postup a také nízké náklady. Jelikož jsou sledovány jednotlivé buňky, stačí k provedení testu velmi malé množství buněk i testované látky. Pro vysokou senzitivitu při méně rozsáhlém poškození DNA je technika hojně využívaná k odlišení genotoxické a cytotoxické kancerogenity a jako základní vyšetření kancerogenity nových látek (Hruda, 2010). Další ověřující laboratorní technikou byl jadérový test kostní dřeně, který prokázal, že rutin nezpůsobuje poškození DNA v kostní dřeni, ale hlubší rozbor pomocí SCG prokázal poškození při dávce 2 x 1250 mg/kg. Naopak u kvercetinu bylo prokázáno vyšší poškození organismu pomocí metody SCG při všech zmiňovaných dávkách (de Silva, 2002).

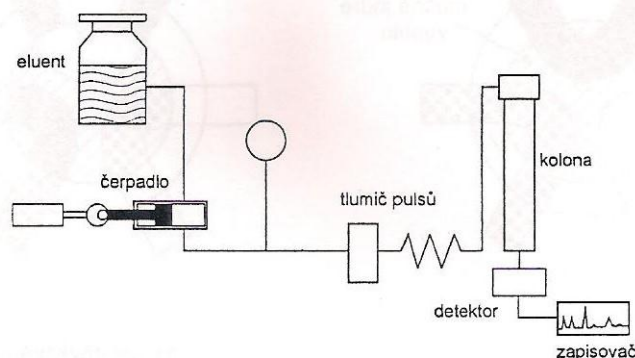
## **5.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)**

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 tenkovrstevná chromatografie) a v uzavřeném systému (dnes zejména vysokoúčinná kapalinová chromatografie HPLC) (Drbal a Křížek, 1999).

### **5.2.1 Přístroje pro kapalinovou chromatografii**

Mezi plynovým a kapalinovým chromatografem existuje jistá podobnost. Mobilní fáze je při isokratické eluci vedena ze zásobníku přes odplynovač do vysokotlakového čerpadla, při gradientové eluci se komponenty mobilní fáze přivádějí do ze zásobníku do směšovače, kde se programově mísí ve zvoleném poměru a teprve pak postupují do čerpadla. Odtud je mobilní fáze vedena přes tlumič pulzů do kolony. Kolona bývá obvykle vyrobena z nerez oceli či speciálního skla a bezprostředně za ní je připojen detektor a ten je spojen se zařízením pro registraci průběhu analýzy (Drbal a Křížek, 1999).

Obr. 22: Schéma isokratického kapalinového chromatografu



### 5.2.2 Čerpadla u HPLC a dávkování vzorků

Běžně se u HPLC pracuje s tlaky od 1 do 60 MPa, při průtocích mobilní fáze v rozsahu od 0,1 do 10 ml.min<sup>-1</sup>. V dnešní době se u HPLC více používají kontinuálně pulzující čerpadla pístová či membránová. Při každém pohybu membrány či pístu vpřed dochází k vytlačení malého objemu mobilní fáze do systému. Pulzace je tlumena zařazením dalšího čerpadla pracujícího v opačné fázi a/nebo zařazením tlumiče pulzů (Drbal a Křížek, 1999).

Nejvíce převažujícím způsobem nástřiku vzorků je použití tzv. šesticestného kohoutu s dávkovací smyčkou. Smyčka o známém konstantním objemu se nejprve naplní vzorkem, poté se kohout přepne do druhé polohy, kdy eluent protéká smyčkou a vnese roztok do kolony (Drbal a Křížek, 1999).

### 5.2.3 Kolony pro HPLC

Pro HPLC se používají kolony o délce 10–100 cm, nejčastěji 10–20 cm s vnitřním průměrem od 0,2 do 2 cm. Při dělení směsí se kolony řadí za sebou. U přírodních vzorků, jež obsahují mnoho balastních látek, které by mohly vyvolat předčasné znehodnocení kolony, se často před vlastní kolonou zařazuje ochranná předkolonka. Kolony pro HPLC jsou dnes plněny profesionálně a velikost zrn sorbentu se pohybuje mezi 3–50 μm, ale nejčastěji mezi 5–10 μm (Drbal a Křížek, 1999).

## 5.2.4 Rozdělení HPLC podle použití adsorbentu

### 5.2.4.1 Kapalinová adsorpční chromatografie (LSC)

U LSC se používá několik typů adsorbentů, kterými jsou silikagel, alumina a florosil. Silikagel je polárním adsorbentem slabě kyselých vlastností. Z toho důvodu silně retarduje bazické látky. Bývá obvykle amorfni struktury, snadno přijímá vodu a před použitím je běžná aktivace při 180 °C. Alumina je krystalická forma  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Na rozdíl od silikagelu je povrch zrn bazický, čehož lze využít k oddělení slabě kyselých složek vzorku. Aktivuje se obvykle zahříváním na 400 °C po dobu 6–16 hodin. Florosil je křemičitan hořečnatý, který je slabým kyselým polárním adsorbentem (Drbal a Křížek, 1999).

Při LSC je povrch adsorbentu obsazen molekulami eluentu, po vnesení vzorku do kolony musí molekula složky vytěsnit z povrchu adsorbentu odpovídající počet molekul eluentu. Velký vliv má velikost interakce mezi eluentem a povrchem adsorbentu, tato interakce je označována jako eluční síla. Z běžných rozpouštědel má nejnižší eluční sílu pentan a nejvyšší voda. Čím je eluční síla rozpouštědla vyšší, tím pevněji je eluent adsorbován a složka je adsorbována méně (Drbal a Křížek, 1999).

### 5.2.4.2 Kapalinová rozdělovací chromatografie (LLC)

Jako adsorbenty při tomto typu chromatografie se dnes výhradně používají stacionární fáze chemicky vázané na reaktivním nosiči. Základem těchto náplní je silikagel, jehož povrch je derivatizací upraven tak, že na fázovém rozhraní stacionární a mobilní fáze jsou fixovány skupiny:

nepolární:  $\text{C}_8\text{H}_{17}$ -,  $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ -, fenyl

středně polární až polární:  $-\text{C} \equiv \text{N}$ ,  $-\text{NH}_2$

Dnes převažuje použití nepolárních, oktadecylových skupin. Chromatografii na těchto typech označujeme jako chromatografii na reverzní fázi (Drbal a Křížek, 1999).

### **5.2.4.3 Chromatografie na reverzní fázi**

U klasické chromatografie se používá polární silikagel jako stacionární fáze a nepolární rozpouštědlo jako mobilní fáze, ale u reverzní chromatografie je to přesně naopak jako nepolární (hydrofobizovaný) silikagel je použit pro stacionární fázi a polární látky pro mobilní fázi. Jako mobilní fáze se nejčastěji používají binární či ternární směsi vody, methanolu, acetonitrilu, tetrahydrofuranu či dioxanu. Úpravou pH mobilní fáze můžeme měnit retenční parametry mnohých látek. Zvýšením pH se zvýší retenční časy bazických složek a sníží retenční časy složek kyselých. Opačného efektu docílíme snížením pH mobilní fáze. Chromatografie s reverzními fázemi se dnes používá u 80 % aplikací HPLC (Drbal a Křížek, 1999).

### **5.2.5 Detektory pro HPLC**

Nejvíce je rozšířen u HPLC průtokový fotometrický či fluorometrický detektor. Eluát protéká měrnou celou malého objemu s velkou optickou délkou (obvykle  $V = 5-10 \mu\text{l}$ ,  $l = 10 \text{ mm}$ ). Při vhodně zvolené 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. Méně běžným detektorem je refraktometrický detektor registrující změny indexu lomu eluátu (Drbal a Křížek, 1999).

### **5.2.6 Kvalitativní a kvantitativní analýza**

Základní způsob kvalitativního vyhodnocení chromatogramů je založen na znalosti retenčních dat dělených látek. Identifikace spočívá v porovnání retenčního času neznámé látky a standartu separovaných za stejných podmínek (Drbal a Křížek, 1999).

Kvantitativním údajem detektorů je plocha pod eluční křivkou. Plochu je možno měřit řadou způsobů. Nejběžněji se postupuje násobením výšky píku šířkou v polovině výšky píku. Moderní chromatografy jsou však pravidelně vybaveny integrátorem plochy píků, jenž je dnes často součástí řídicího počítače chromatografu (Drbal a Křížek, 1999).

## 5.2.7 Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie

Výhodou kapalinové chromatografie oproti plynové chromatografii, kdy s látkami pracuje obvykle za zvýšené teploty, je šetrnější stanovování nejrůznějších, zejména organických látek. Výhodnější je použití HPLC zejména kvůli těkavým látkám tam, kde vznikají potíže s plynovou chromatografií. Obě techniky se tak vhodně doplňují. Složky, jež běžnými detektory pro HPLC nelze dobře detekovat, se převádějí na snadno detekovatelné deriváty (Drbal a Křížek, 1999).

Kvalitativní a kvantitativní analýzy flavonoidů u *Desmodium canadense* (L.) DC byly provedeny pomocí použití techniky HPLC. Z celkového počtu 15 flavonoidů byly identifikovány aglykony a glykosidy včetně apigeninu, apigenin-7-O-glykosidu, luteolinu, rutinu, vicenin-2, vitexinu, isovitexinu, vitexin rhamnosidu, orientinu, homoorientinu, kvercetin, kvercitrinu, hyperosidu, astragalinu a kaempferolu. Maximální množství identifikovaných flavonoidů (13573,83 µg/g) bylo pozorováno v pučící fázi. Flavonoidy, které převažovaly: orientin a homoorientin (6236,24 µg/g), vicenin-2 (2044,25 µg/g), vitexin (1717,12 µg/g) a rutin (925,72 µg/g) (Puodziunene et al, 2009).

Fenolické kyseliny a flavonoly byly izolovány z třešní a analyzovány pomocí HPLC. Mezi nejvíce zastoupené fenolické kyseliny patří neochlorogenová kyselina (15–20 mg/kg), chlorogenová kyselina (19-62 mg/kg) a deriváty kyseliny p-kumarové (15–125 mg/kg). Kvercetin-3-rutinosid (8-37 mg/kg) byl také analyticky identifikovaný. Obsah fenolických kyselin a flavonolů je také závislý na typech vegetativních podnoží. Bylo prokázáno, že vyšší obsah kyseliny chlorogenové, kyseliny neochlorogenové, derivátů kyseliny p-kumarové a kvercetin-3-rutinosid byl u podnoží typu Weiroot 13 a PiKu 1. Obsah fenolických kyselin a flavonolů byl nižší u jiných typů podnoží (Jakobek et al, 2009).

## 6. Cíle práce

Z literární rešerše vyšlo najevo, že mnohé rostliny, které se používají jako každodenní strava, obsahují mnoho fenolických látek či flavonoidů. Tyto látky jsou v určitých ohledech pro organismus příznivé. Jejich největší kladnou vlastností je schopnost navazovat na sebe škodlivé radikály, čímž se stávají účinnými antioxidanty v lidském těle.

Podle výzkumů, které probíhají již po dvě dekády, bylo prokázáno, že jsou velice účinným nástrojem proti některým civilizačním chorobám (arterioskleróze, nádorovým a kardiovaskulárním onemocněním).

Cílem této práce je zjistit změny a chování flavonoidů v lidském trávicím traktu, přesněji v lidském žaludku, a to rutinu, kvercetin a fenolické kyseliny chlorogenové. Jako vzorky pro tuto práci byly vybrány: laskavec (*Amaranthus*), pohanka setá (*Fagopyrum esculentum moench L.*) a bez černý (*Sambucus nigra L.*).

Nejvíce zkoumanými látkami byly rutin a kvercetin, které svým chováním mohou měnit či dokonce ničit DNA v kostní dřeni. Proto naším cílem bylo zjistit, jak se tyto látky změní po určitém časovém působení kyseliny chlorovodíkové při konstantní lidské teplotě 37°C.

Látky byly analyzovány pomocí kapilární elektroforézy a kapalinové chromatografie.

Řešení bylo zaměřeno na následující cíle:

- Zjistit a zapsat do literární rešerše výskyt fenolických látek a popsat jejich důležitost ve výživě a jejich chování v procesu trávení.
- Naučit se postup pro úpravy vzorku rostlinného materiálu pro účely analýzy a postup při stanovení obsahu vybraných fenolických látek metodou kapilární elektroforézy (CZE) a kapalinové chromatografie (HPLC).
- Navrhnout sérii pokusů, modelujících proces trávení v žaludku a stanovení základního obsahu pomocí kapilární elektroforézy (CZE) a kapalinové chromatografie (HPLC).
- Vyhodnotit změny látek, které nastaly po simulaci trávení v žaludku.

## **7. Experimentální část**

### **7.1 Použité chemikálie a standardy**

Všechny použité chemikálie měly analytickou čistotu. Pro všechny práce byla použita demineralizovaná voda, která byla připravena na zařízení firmy Premier (USA).

tetraboritan sodný (borax) (Sigma Chemicals, USA)

kyselina chlorovodíková (Lachema, ČR)

hydrogenuhličitan sodný (Lachema, ČR)

laurylsíran sodný (Sigma Chemicals, USA)

kyselina boritá (Lachema, ČR)

hydroxid sodný (Lachema, ČR)

rutin (Sigma Chemicals, USA)

kyselina 1 – naftyloctová (Lachema, ČR)

kyselina L – askorbová (Merck, Německo)

kvercetin (Aldrich Chemie, Německo)

acetonitril (LiChrosolo Merck, Německo)

methanol (Penta Chrudim, ČR)

### **7.2 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 µl a 100 – 1000 µl 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 kolonky RP – 18 (Merck, Německo)  
pH – metr Inolab – 1, s elektrodou SenTix 61 (WTW, Německo)  
Systém Hewlett-Packard (HP 1050 HPLC, USA)  
G1315B DAD detektor (Agilent)  
Kolona: Luna C18 (2) (150x2 mm, 3 um) (Phenomenex USA)

### 7.3 Odběr a úprava rostlinného materiálu

Pro experimenty byly vybrány druhy rostlin, které jsou prokazatelně bohaté na flavonoidy, a jiné fenolické látky, které jsou použitelné při stravování. Mezi tyto zkoumané druhy patří dva druhy z rodu *Amaranthus*, pohanka setá a bez černý. Z těchto vybraných vzorků se laskavec a pohanka pěstují, bez černý je volně rostoucí v přírodě České republiky. Dají se využít jako listová zelenina (jako salát či pro tepelnou přípravu) nebo jako materiál pro přípravu čajů.

Druhy:

Laskavec červenoklasý (*A. hypochondriacus*), odrůda Koniz.

Laskavec krvavý (*A. cruentus*), odrůda Amar.

Pohanka setá (*Fagopyrum esculentum*), odrůda Pyra.

Bez černý, *Sambucus nigra*

Vzorky pohanky a laskavců byly vypěstovány v roce 2010 na pokusném pozemku ZF (České Budějovice, kampus Jihočeské univerzity, N 48°58'29.528", E 14°26'52,057") a získány ve spolupráci s doc. Pexovou Kalinovou z katedry rostlinné výroby a agroekologie. Vzorek bezu černého byl získán z volně rostoucích porostů v katastru obce Žitná (N 49°2'40,218", E 14°7'29,720").

Květenství bezu černého bylo odebráno v červnu 2010 v době květu daného druhu. Pěstované druhy nebyly během růstu ani hnojeny, ani nijak ošetřovány. Vzorky listů a květenství byly odebrány v červenci 2010.

Veškerý rostlinný materiál byl vzápětí po odběru zmražen (-16°C) a do jednoho měsíce od odběru lyofilizován (0,1 mbar, -50°C, 24 hodin). Lyofilizovaný materiál byl homogenizován na laboratorním mlýnku a homogenní materiál byl uchováván v uzavřené skleněné vzorkovnici v mrazicím boxu (-18°C).

## **7.4 Uspořádání a úprava rostlinného materiálu**

### **7.4.1 Návrh experimentu žaludku**

Hlavním úkolem bylo navrhnout experiment, který by mohl simulovat trávení v lidském žaludku. Základem pro tento experiment byla kyselina chlorovodíková, která je součástí žaludečních žláz a je produkována buňkami žaludku. Její kyselost se pohybuje okolo 2 pH, což odpovídá koncentraci 0,02 mol/l. Vnitřní prostředí tedy bylo simulováno pomocí roztoku kyseliny chlorovodíkové a teploty pohybující se okolo 37°C, což je teplota lidského těla, jež byla simulována pomocí vodní lázně. Poté bylo důležité nasimulovat udržení daného vzorku v žaludku po dobu dvou, čtyř a šesti hodin. Zdržení potravy v žaludku je různě dlouhé a záleží na převažující živině v konzumované potravě. Sacharidy se zdrží v žaludku po dobu dvou hodin, bílkoviny po dobu čtyř hodin a tuky po dobu šesti hodin.

#### **7.4.1.1 Simulace trávení v žaludku**

Do varné baňky o objemu 100 ml jsme navážili 1 g materiálu a následně přidali 50 ml připravené kyseliny chlorovodíkové o pH 2 a koncentraci 0,02 mol/l. Varnou baňku jsme umístili do vodní lázně při teplotě 37°C na dvě, čtyři a šest hodin. Po této době jsme obsah převedli do odstředivacích kyvet a odstředovali jej rychlostí 3500 otáček za minutu po dobu 10 minut. Kapalný podíl jsme přefiltrovali přes buničinu a následně slili do plastových uzavíratelných zkumavek a zmrazili pro další analýzy na kapalinovém chromatografu (HPLC) a kapilární elektroforéze (SPE).

Tabulka 2: Identifikace vzorků

| Označení | Rostlina      | Kód     | Použitá část |
|----------|---------------|---------|--------------|
| 1.       | amarant Koniz | Koniz K | květenství   |
| 2.       | amarant Koniz | Koniz L | listy        |
| 3.       | amarant Amar  | Amar K  | květenství   |
| 4.       | amarant Amar  | Amar L  | listy        |
| 5.       | pohanka Pyra  | Pyra K  | květenství   |
| 6.       | pohanka Pyra  | Pyra L  | listy        |
| 7.       | bez černý     | Bez K   | květenství   |

## 7.4.2 Metodika stanovení pro MECC

Pro stanovení volného kvercetinu a rutinu byla zvolena analytická metoda, která byla vyvinuta na Katedře aplikované chemie Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity. Tato metoda vycházela z práce, která se věnovala stanovení glykosidů kvercetinu (Dadáková, Kalinová, 2010).

### 7.4.2.1 Stanovení rutinu a volného kvercetinu v rostlinných vzorcích metodou MECC

Cílem této analýzy bylo zjistit obsah rutinu v základním rostlinném vzorku, který jsme pak dále použili při simulaci procesu trávení v žaludku. Také bylo možné zjistit obsah volného kvercetinu.

Rutin (kvercetin-3-O-rhamnoglukosid) je nejběžnějším glykosidem kvercetinu a vyskytuje se u mnoha rostlinných zástupců. Pro stanovení rutinu je dostatečná extrakce z rostlinného materiálu pomocí organického rozpouštědla.

Do varné baňky o objemu 100 ml se vložila navážka 0,25 g lyofilizovaného homogenizovaného rostlinného vzorku, který jsme navážili na analytických vahách s přesností na 0,1 mg. Poté jsme přidali 80 mg kyseliny askorbové, 12,5 ml methanolu a 12,5

ml vody. Vzniklá směs byla zahřívána po dobu jedné hodiny ve vodní lázni pod zpětným chladičem při teplotě 90°C. Následně jsme daný vzorek nechali chladnout po dobu deseti minut mimo lázeň, ale stále pod zpětným chladičem. Extrahovaný vzorek jsme převedli kvantitativně do odstředivací kyvety a následně odstředili (15 minut, 3500 otáček za minutu). K sedimentu jsme přidali 7,5 ml methanolu a vody a odstředili za stejných podmínek. Poté byl vzorek odstředěn ještě jednou za stejných podmínek. Odstředování vzorku probíhalo celkem třikrát. Spojené supernatanty jsme shromáždily v kádince o objemu 600 ml a doplnili je vodou na 200 ml. Následně jsme změřili pH vzorku a upravili jej na hodnotu pH = 3 pomocí roztoku kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 1 mol/l.

Vzorek jsme následně přefiltrovali přes filtr ze skleněných vláken za sníženého tlaku. Filtr byl poté promyt 5 ml methanolu za normálního tlaku. Filtrát byl kvantitativně převeden do odměrné baňky o objemu 500 ml, doplněn po rysku a promíchán. Tento roztok jsme použili pro kapilární elektroforézu (SPE) na kolonkách. Zachycené látky byly eluovány pomocí 1,4 ml methanolu do měrné vialky. Do vialky jsme přidali 0,1 ml roztoku vnitřního standardu (methanolický roztok kyseliny 1 – naftyloctové o koncentraci 2 mg/ml).

#### **7.4.2.2 Stanovení rutinu a volného kvercetinu v kapalných vzorcích**

Cílem této analýzy bylo zjistit obsah rutinu ve vzorku, který přešel za podmínek pokusu do roztoku. Další sloučenina, která byla sledována, byl volný kvercetin, jenž by se během procesu trávení mohl uvolnit z rutinu nebo dalších jeho glykosidů.

Do kádinky o objemu 600 ml jsme odměřili a přidali 200 ml destilované vody, 80 mg kyseliny askorbové a 25 ml ethanolu. Automatickou pipetou jsme přidali 2,5 ml kapalného vzorku. Poté jsme změřili pH a upravili jeho hodnotu na pH = 3 pomocí jednomolární kyseliny chlorovodíkové. Následně jsme směs přefiltrovali přes filtr ze skleněných vláken na vakuovém filtračním zařízení a filtrát kvantitativně převedli do odměrné baňky o objemu 500 ml, doplnili po rysku a promíchali. Bez ředění jsme vzorek aplikovali na SPE kolonky. Zachycené látky byly eluovány pomocí 1,4 ml methanolu do odměrné vialky. Do vialky jsme přidali 0,1 ml roztoku vnitřního standardu (methanolický roztok kyseliny 1 – naftyloctové o koncentraci 2 mg/ml).

Vzorky jsme změřili na kapilární elektroforéze. Pracovní pufr: 10 mM boraxu, 10 mM kyseliny borité, 20 mM SDS, 15% (v/v) methanolu, pH = 9,2. Podmínky analýzy: 25°C, 20 kV, detekce analytu při 270 nm, hydrodynamický nástřík 2s. Analýza trvala 20 minut.

Jako analytická odezva byl brán poměr ploch píků analyzované látky a vnitřního standardu. Kvantifikace obsahu kvercetin a rutinu byla provedena pomocí kalibračních závislostí. Pro výpočty byl použit program Microsoft Excel.

### **7.4.3 Metodika stanovení pro HPLC**

Při stanovení pomocí kapalinové chromatografie (HPLC) jsme sledovali rutin, volný kvercetin a další fenolické sloučeniny. Mezi tyto fenolické sloučeniny patří také kyselina chlorogenová a deriváty kyseliny kávové. Tato analýza byla provedena na pracovišti Centra výzkumu globální změny AV ČR v.v.i., v laboratoři metabolimiky a izotopových analýz pod vedení RNDr. Vrchotové, CSc.

#### **7.4.3.1 Extrakce pro stanovení HPLC**

Pro tuto extrakci jsme použili 70% methanol (v/v) o objemu 70 ml. Poté jsme přidali 0,25 g dané zkoumané látky a 3 ml 70% methanolu. Tato směs byla protřepávána na Vortexu po dobu 30 minut. Po vyjmutí jsme směs protřepávali po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Následně se zkumavky odstředili na dobu 10 minut při otáčkách 3000 za minutu. Po odstředění jsme odebrali supernatant. K sedimentu jsme přidali 1 ml 70% methanolu a po dobu 15 minut jsme směs nechali protřepávat. Po uplynulé době byla směs znovu centrifugována za stejných podmínek a následně jsme odebrali sediment. K němu jsme přidali 1 ml 70% metanolu, protřepali směs a pak ji odstředovali po dobu 10 minut při otáčkách 3000 za minutu.

#### **7.4.3.2 Identifikace fenolických látek pomocí HPLC**

Připravené vzorky jsme proměřili na kapalinovém chromatografu Hewlett-Packard (HP 1050 HPLC, USA) s detektorem G11315B DAD (Agilent) a kolonou Luna C18 (2) (150x2 mm, 3 um) (Phenomenex, USA).

Mobilní fáze byly použity voda, acetonitril a s přidavkem kyseliny fosforečné.

Složení jednotlivých mobilních fází:

Mobilní fáze A: 5% acetonitril + 0,1% kyseliny fosforečné

Mobilní fáze B: 80% acetonitril + 0,1% kyseliny fosforečné

### **7.4.3.3 Použitý gradient**

První gradient, který byl použit, byl v rozsahu 95% A a 5% B hned na začátku měření tedy od 0. minuty. Druhý gradient byl v rozsahu 65% A a 35% B v časovém úseku 55 minut po začátku analýzy. Jako třetí gradient byl použit 40% A a 60% B v době 60 minut od začátku analýzy. Všechny gradienty měly průtok 0,25 ml/min při pracovní teplotě 25°C. Během analýzy byly všechny látky měřeny v rozsahu spektra od 190 nm do 600 nm.

## 8 Výsledky

Flavonoidy jsou látky přírodního charakteru, jež jsou obsaženy ve všech typech rostlinné flory. Mají pozitivní i negativní vlastnosti. Mezi ty pozitivní patří zejména prevence proti civilizačním chorobám a antioxidační účinky. Negativními vlastnostmi, které byly zjištěny, jsou poškození DNA a jadérek v kostní dřeni při vyšší koncentraci volného kvercetinu.

Kvůli velkému množství sloučenin flavonoidů v rostlinách můžeme předpokládat, že existuje více směsí těchto látek. Stanovení každé z látek bylo velice náročné kvůli nedostatku standardů.

K získání experimentálních dat byly použity dvě na sobě nezávislé metody, a to metoda micelární elektrokinetické kapilární chromatografie (MECC) a metoda kapalinové chromatografie (HPLC).

Tato práce byla zaměřena na stanovení rutinu a volného kvercetinu a jejich změny při působení prostředí žaludku na rostlinný materiál běžně používaný v České republice. Pro stanovení byla použita metoda MECC, která pro nás byla výhodná, protože vyžaduje jen malé množství rozpouštědel a na organickou analýzu je poměrně jednoduchá. Pro další stanovení látek byla použita metoda HPLC.

Materiál, který byl použit pro daný experiment, byl vypěstován na pozemcích Zemědělské fakulty v roce 2010 nebo byl získán sběrem z volně rostoucích rostlin.

### 8.1 Základní obsah rutinu ve vybraných rostlinách

Rutin (kvercetin-3-O-rhamnoglukosid), který je nejběžnějším glykosidem kvercetinu, se vyskytuje v mnoha druzích rostlin, ale není rozšířen tolik jako kvercetin.

Analýzou homogenizovaného materiálu byl zjištěn obsah rutinu v daných vzorcích. Největší obsah rutinu byl zjištěn v pohance (listy i květy) a také vyšší množství bylo stanoveno v případě bezu černého. Stanovený obsah rutinu je srovnatelný s hodnotami nalezenými v literatuře (Dawidowicz et al., 2003). Výsledky jsou uvedeny v tabulce číslo 3.

Tabulka 3: Obsah rutinu

| Označení | Kód     | obsah rutinu (mg/kg) |
|----------|---------|----------------------|
| 1.       | Koniz K | 7625                 |
| 2.       | Koniz L | 13450                |
| 3.       | Amar K  | 7590                 |
| 4.       | Amar L  | 17150                |
| 5.       | Pyra K  | 60700                |
| 6.       | Pyra L  | 63350                |
| 7.       | Bez K   | 22750                |

### 8.1.1 Výsledky experimentů

Pro daný pokus byla zvolena metoda, při které jsme daný materiál umístili do baňky o objemu 100 ml, do níž jsme vložili homogenizovaný materiál a 1M kyseliny chlorovodíkové. Tuto směs se i s baňkou umístila do vodní lázně při konstantní teplotě 37°C na dobu dvou, čtyř a šesti hodin. Toto časové zdržení je důležité, protože v lidském žaludku se udržují určité látky po různá časová období (sacharidy po dobu dvou hodin, bílkoviny po dobu čtyř hodin a tuky po dobu šesti hodin). Výsledky jsou v tabulkách 4 až 6, kde byl sledován obsah rutinu a obsah volného kvercetinu.



Tabulka 4: Zdržení dvě hodiny

| Označení | Kód       | obsah rutinu (mg/kg) |
|----------|-----------|----------------------|
| 1.       | koniz-k-2 | 144                  |
| 2.       | koniz-l-2 | 271                  |
| 3.       | amar-k-2  | 136                  |
| 4.       | amar-l-2  | 304                  |
| 5.       | pyra-k-2  | 414                  |
| 6.       | pyra-l-2  | 157                  |
| 7.       | bez-k-2   | 297                  |

Tabulka 5: Zdržení čtyři hodiny

| Označení | Kód       | obsah rutinu (mg/kg) |
|----------|-----------|----------------------|
| 1.       | amar-k-4  | 115                  |
| 2.       | amar-l-4  | 252                  |
| 3.       | koniz-k-4 | 137                  |
| 4.       | koniz-l-4 | 245                  |
| 5.       | pyra-k-4  | 304                  |
| 6.       | pyra-l-4  | 159                  |
| 7.       | bez 4     | 263                  |

Tabulka 6: Zdržení šest hodin

| Označení | Kód       | obsah rutinu (mg/kg) |
|----------|-----------|----------------------|
| 1.       | amar k 6  | 110                  |
| 2.       | amar l 6  | 219                  |
| 3.       | koniz k 6 | 122                  |
| 4.       | koniz l 6 | 247                  |
| 5.       | pyra k 6  | 296                  |
| 6.       | pyra l 6  | 155                  |
| 7.       | bez k 6   | 267                  |

Podle získaných výsledků jsme zjistili, že u laskavce červenoklasého (*A. hypochodriacus*) obsah rutinu klesá ve všech zmíněných časových intervalech, kde nejvyšší hodnoty docílí po dvou hodinách a nejnižší po šesti hodinách. Tuto tendenci sledujeme jak u květů, tak i u listů. Týká se jak relativních, tak i absolutních hodnot. U laskavce krvavého (*A. cruentus*) bylo zjištěno, že obsah rutinu u květů je konstantní po dobu dvou a čtyř hodin, ale po šesti hodinách se jeho obsah snižuje u absolutních hodnot. U listů je tento jev opačný. Po dvou hodinách je hodnota obsahu nejvyšší a poté klesá na konstantní hodnotu. Po čtyřech a šesti hodinách se tento jev týká absolutních hodnot. U relativních hodnot je v případě listů i květů zřetelná tendence snižovat obsah rutinu. U pohanky seté (*Fagopyrum esculentum*) obsah rutinu klesá jen u květů, u listů zůstává víceméně nezměněn. Platí jak pro absolutní hodnoty, tak i pro ty relativní. U bezu černého (*Sambucus nigra*) je nejvyšší obsah rutinu po dvou hodinách a poté klesá. Na stejné hodnotě je pak i po čtyřech a šesti hodinách jak u absolutních, tak i relativních hodnot. Tyto výsledky jsou reprodukovány v tabulce 7 a grafu 1 jako absolutní hodnoty a tabulce 8 a grafu 2 jako relativní hodnoty.

Tabulka 7: Srovnání v absolutních hodnotách

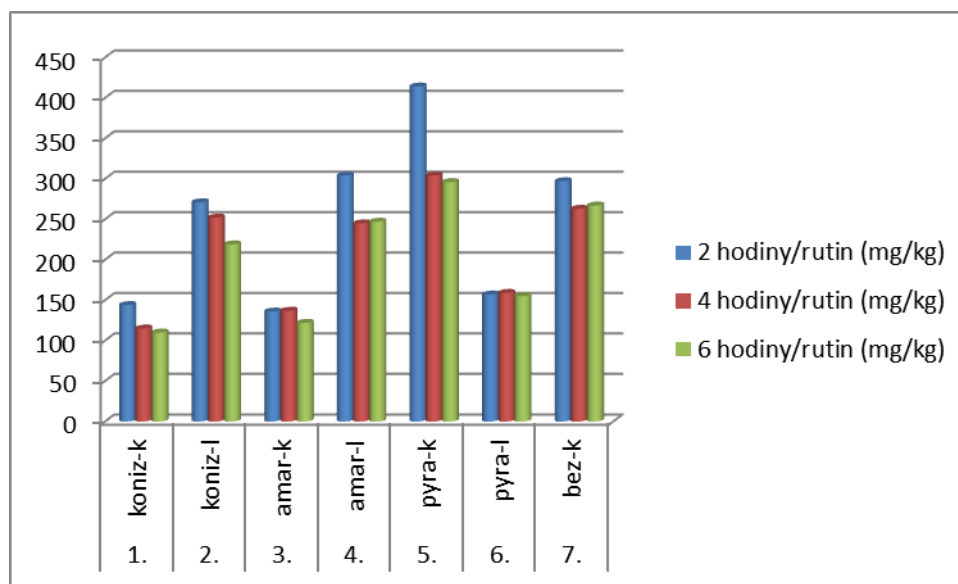
| Označení | Kód     | 2 hodiny/rutin | 4 hodiny/rutin | 6 hodiny/rutin |
|----------|---------|----------------|----------------|----------------|
|          |         | (mg/kg)        |                |                |
| 1.       | koniz-k | 144            | 115            | 110            |
| 2.       | koniz-l | 271            | 252            | 219            |
| 3.       | amar-k  | 136            | 137            | 122            |
| 4.       | amar-l  | 304            | 245            | 247            |
| 5.       | pyra-k  | 414            | 304            | 296            |
| 6.       | pyra-l  | 157            | 159            | 155            |
| 7.       | bez-k   | 297            | 263            | 267            |

Z tabulky číslo 8 je vidět, že u pohanky dochází k menšímu uvolňování rutinu v prostředí žaludku. Při úpravě vzorku pohanky se tento materiál choval špatně a to při filtrování, které bylo velice obtížné, protože měl špatnou konzistenci, takže je možné, že pohanka obsahuje látky, které tento jev způsobují. Těmito látkami by mohly být nejspíše polysacharidy.

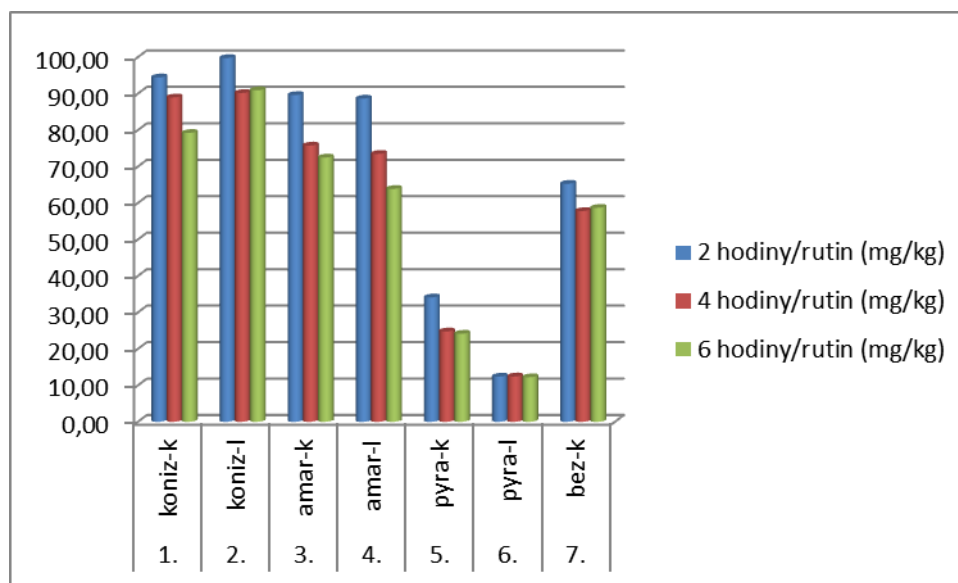
Tabulka 8: Srovnání v relativních hodnotách

| Označení | Kód     | 2 hodiny/rutin | 4 hodiny/rutin | 6 hodiny/rutin |
|----------|---------|----------------|----------------|----------------|
|          |         | (%)            |                |                |
| 1.       | koniz-k | 94,4           | 89             | 79,2           |
| 2.       | koniz-l | 99,8           | 90,2           | 90,9           |
| 3.       | amar-k  | 89,6           | 75,8           | 72,5           |
| 4.       | amar-l  | 88,6           | 73,5           | 63,9           |
| 5.       | pyra-k  | 34,1           | 24,8           | 24,1           |
| 6.       | pyra-l  | 12,4           | 12,4           | 12,2           |
| 7.       | bez-k   | 65,3           | 57,8           | 58,7           |

Graf 1: Srovnání v absolutních hodnotách



Graf 2: Srovnání v relativních hodnotách



Jak je možno vidět, rutin skoro ve všech případech snižuje svou koncentraci. Rutin jako glykosid kvercetinů by mohl uvolňovat volný kvercetin, ale ze všech analýz, které byly provedeny, nebyl zjištěn žádný volný kvercetin. Pokles obsahu rutinu může být vysvětlen jeho oxidací na jiné produkty. Pokles je ale vzhledem k obsahu rutinu poměrně nízký. Pokles

rutinu oproti původnímu množství se pohyboval od 0,2%, který je u amarantu Koniz až po 87,8%, který je u pohanky.

Nejvíce rutinu se uvolní z amarantu Koniz a to 99,8 % a nejméně se uvolnilo rutinu z pohanky 12,2 %.

### 8.1.2 Výsledky z HPLC

Analýza byla provedena na systému Hewlett-Packard (HP 1050 HPLC, USA) při použití G1315B DAD detektorem (Agilent) na koloně Luna C18 (2) (150 x 2 mm, um) (Phenomenex, USA), při použitém spektru 190 – 600 nm. Mobilní fáze A byla 5% acetonitril + 0,1% kyseliny fosforečné a mobilní fáze B 80% acetonitrilu s 0,1% kyseliny fosforečné.

Všechny vzorky byly proměřeny na kapalinovém chromatografu a nejdříve byl proměřen vzorek, který nebyl posléze podroben experimentu. Poté byly proměřeny všechny vzorky, které byly podrobeny experimentu. Základní obsah sledovaných látek byl zjištěn z extraktů původního materiálu.

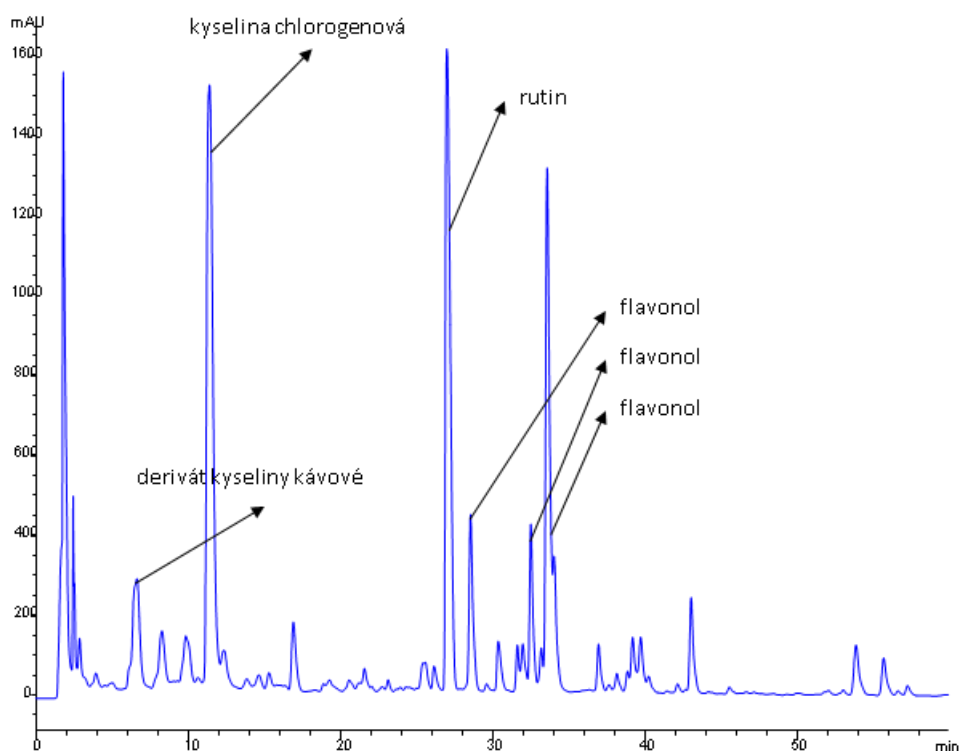
Ze získaných chromatogramů bylo zjištěno, že dané látky se skoro vůbec nemění a nejsou tedy ovlivněny působením žaludku. Mezi hlavními zkoumanými látkami byl rutin a chlorogenová kyselina. V žádném vzorku nebyl nalezen volný kvercetin.

Jako příklad je uvedena analýza černého bezu. Další vzorky byly umístěny do přílohy.

Tabulka 11: Označení vzorků

| Označení                            | Kód     |
|-------------------------------------|---------|
| bez černý bez působení              | Bez K 0 |
| bez černý po působení dvou hodin    | Bez K 2 |
| bez černý po působení čtyřech hodin | Bez K 4 |
| bez černý po působení šesti hodin   | Bez K 6 |

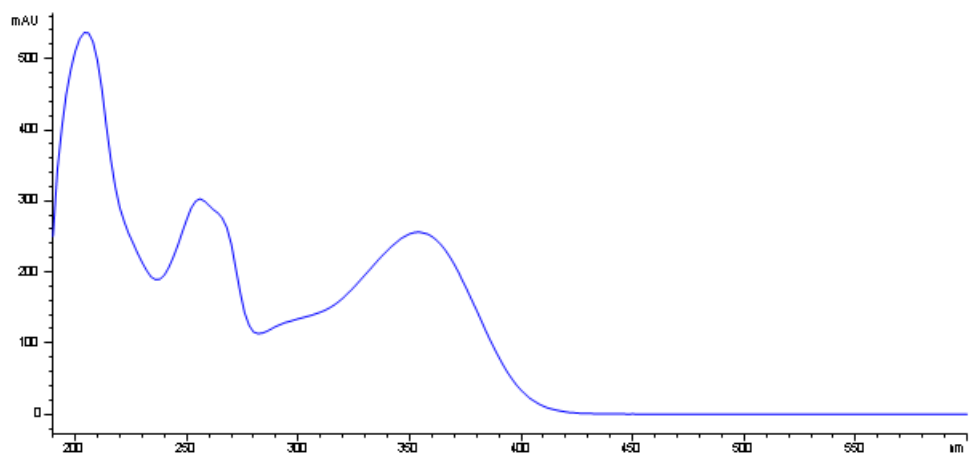
Chromatogram 1: Bez K 0



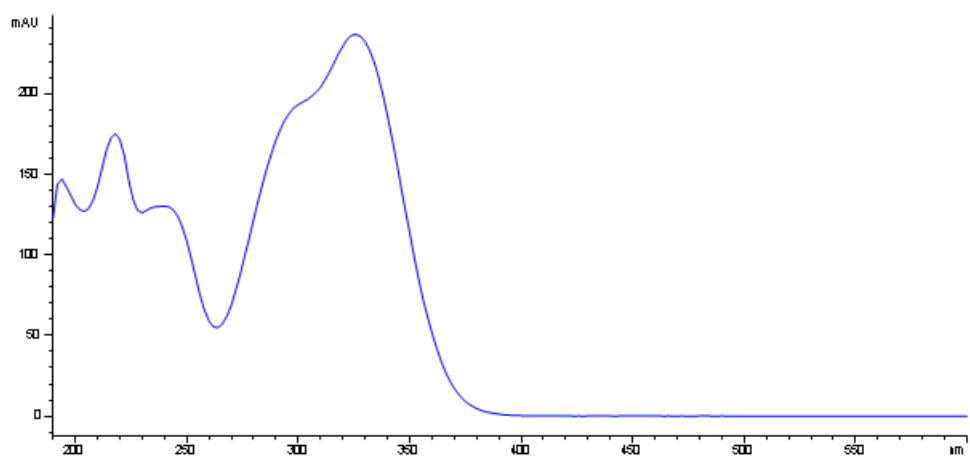
Chromatogram 1 ukazuje přítomnost kyseliny chlorogenové, rutinu a látek, které bylo těžké určit a které nebyly předmětem hledání. Identifikace sloučenin byla provedena podle absorpčních spekter. Látky byly rozděleny do skupin derivátů kyseliny kávové a flavonolů podle charakteristických znaků změřených spekter.

Obrázky 23 a 24 ukazují absorpční spektra rutinu jako představitele flavonolů a kyseliny chlorogenové jako zástupce derivátů kyseliny kávové.

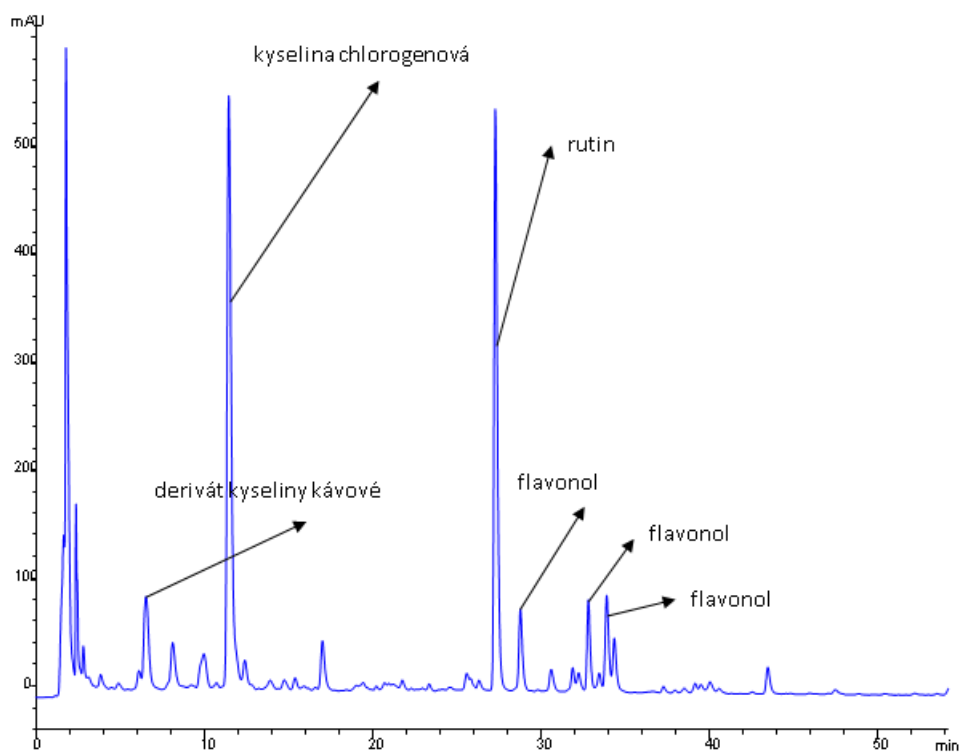
Obr. 23: Spektrum rutinu



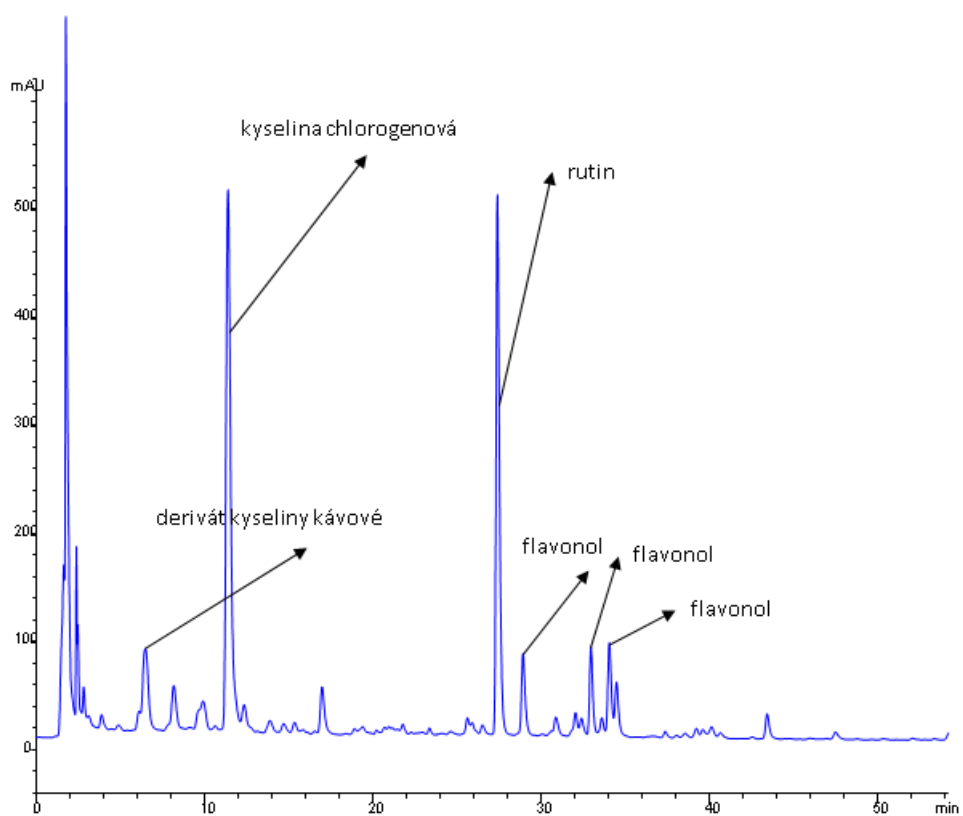
Obr. 24: Spektrum kyseliny chlorogenové



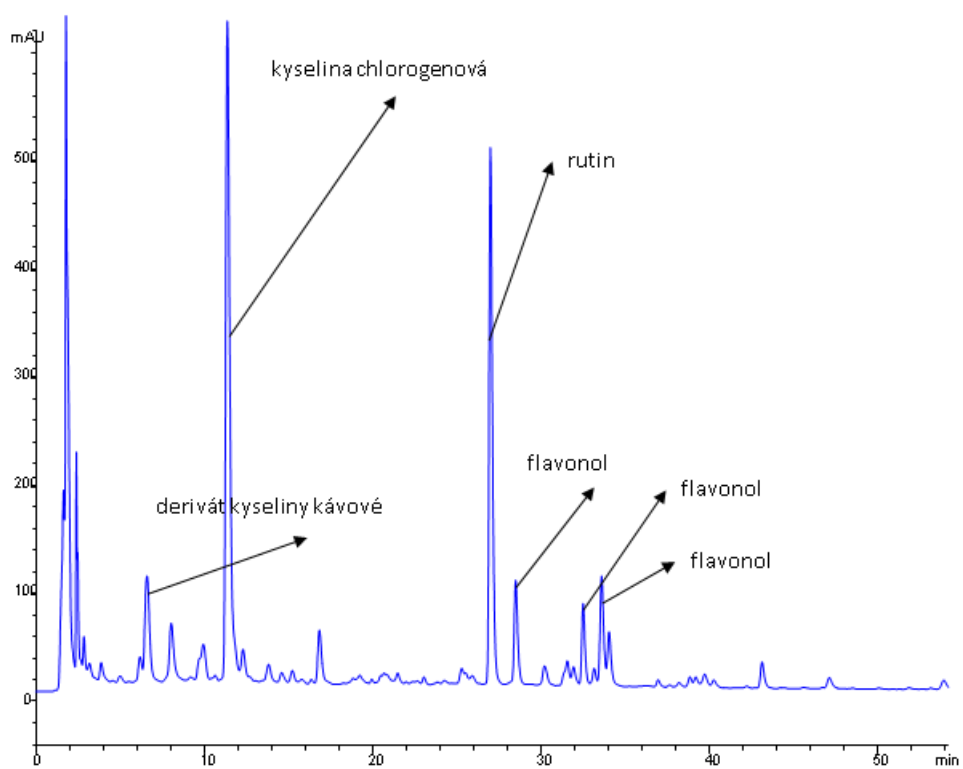
Chromatogram 2: Bez K 2



Chromatogram 3: Bez K 4



Chromatogram 4: Bez K 6





Z chromatogramů je vidět, že k velkým změnám u těchto látek nedošlo. Nejsou tedy do tak velké míry ovlivňovány prostředím žaludku. Jejich množství po dvou, čtyřech a šesti hodinách je konstantní a nedochází u nich k žádným radikálním změnám.

## 9 Závěr

Experiment se zabýval chováním polyfenolů v prostředí žaludku. Je známo, že potrava setrvává v žaludku různě dlouhou dobu podle toho, jaká základní živina v ní převládá. Sacharidy se tráví přibližně 2 hodiny, bílkoviny 4 hodiny a tuky 6 hodin, než žaludek opustí. Stejně časové úseky byly testovány v práci. Jako testovaný materiál byly zvoleny rostliny, které se mohou použít jako zdroj polyfenolů v potravě. Zelené části laskavce a pohanky se mohou konzumovat zasyrova jako salát a také květenství černého bezu se občas konzumuje jako zelenina.

Hlavním polyfenolem byl rutin a fenolické kyseliny jako kyselina chlorogenová, kávová a ferulová. Rutin se vyskytoval ve všech zkoumaných vzorků. Chlorogenová kyselina se vyskytovala skoro ve všech případech, jak je možné vidět na chromatogramech v příloze. U některých vzorků byl také nalezen epikatechin.

Bylo zjištěno, že největší množství rutinu se z materiálu uvolnilo při dvouhodinovém setrvání v žaludku. Při delší prodlevě obsah stanoveného rutinu klesal. Nicméně se v žádném experimentu neobjevil volný kvercetin, což by mělo znamenat, že rutin se jakožto kvercetinový glykosid rozkládá již v prostředí žaludku. To se zřejmě nestává. Pokles obsahu rutinu by mohl být vysvětlen některými dalšími reakcemi. Pokles obsahu rutinu je ale poměrně nízký, pohybuje se od 0,2 % do 87,8%.

Největší množství rutinu se uvolnilo z amarantu obou odrůd a to jak z listů (99,8%), tak z květenství (94,4%).

Překvapivě nízké množství rutinu se uvolnilo z obou vzorků pohanky seté, jen kolem 12%. Pohanka neuvolňuje rutin snadno díky obsahu dalších doprovodných látek.

U metody HPLC byly analyzovány všechny vzorky. Jak je možné vidět z chromatogramů, jejich množství se skoro vůbec nezměnilo. Tedy podle daných závěrů se rutin ani další fenolické kyseliny v žaludku vůbec nemění (tedy v určité nepatrné míře, která je zanedbatelná). Jak bylo napsáno výše, k jejich hlavním změnám dochází až v tenkém střevě.

## 10 Seznam literatury

ANDERSON D., YU T.-W., PHILIPS B.J., SCHMEZER P. (1994): The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygenradical- generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. *Mutation Research* 307, s. 261–271.

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.

BROWN J.P., DIETRICH P.S., (1979): Mutagenicity of plant flavonoids in the Salmonella/mammalian microsome test. Activation of flavonol glycosides by mixed glycosides from rat fecal bacteria and other sources. *Mutation Research* 66, s. 223–240.

COOK N. S., SAMMAN S. (1996): Flavonoids – Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutritional Biochemistry*, vol. 7, s. 66 – 76.

CREBELLI R., AQUILLA E., FALCONE A., CARERE A., (1987): Urinary and faecal mutagenicity in Sprague–Dawley rats dosed with the food mutagens quercetin and rutin. *Food and Chemical Toxicology* 25, s. 9–15.

ČESKÝ LÉKOPIS (1997): [www.lekopis.cz/kap\\_6\\_1\\_Sambuciflos.htm](http://www.lekopis.cz/kap_6_1_Sambuciflos.htm).

DA SILVA J., HERRMANN S. M., HEUSER V., PERIS W., MARRONI POSSA N., GONZALES-GALLEGO J., ERDTMANN B. (2002): Evaluation of genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. *Food and chemical toxicology* 40, s. 941 – 947.

DADÁKOVÁ E., KALINOVÁ J. (2010): Determination of quercetin glycosides and free quercetin in buckwheat by capillary micellar electrokinetic chromatography. *J. Sep. Sci.*, s. 1633 – 1638.

DADÁKOVÁ E., PROCHÁZKOVÁ E., KRÍŽEK M. (2001): Application of micellar electrokinetic capillary chromatography for quantitative analysis of quercetin in plant materials. *Electrophoresis*, s. 1573 – 1578.

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.

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

GASPAR J., LAIRES A., MONTEIRO M. (1993): Quercetin and the mutagenicity of wines. *Mutagenesis* 8, s. 51–55.

HARBOURNE J. B. (1994): *The flavonoids – Advances in research since 1986* Chapman and Hall. London. U. K. ISBN – 0 – 412 – 48070 – 0.

HÄSSING A., LIANG W. X., SCHWABI H., STAMPFLI K. (1999): Flavonoids and tannins: plant – based antioxidants with vitamin character. *Medical hypotheses*, s. 479 – 481.

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.

HRUDA J. (2010): Vliv metabolického stavu buňky na vnímavost k apoptóze indukované oxidačním stresem. [www.is.muni.cz/th/21152/lf\\_d/DESERTACE-IS.text](http://www.is.muni.cz/th/21152/lf_d/DESERTACE-IS.text).

JAKOBEK L., ŠERUGA M., VOCA S., ŠINDRAK Z., DOBRIČEVIČ N. (2009): Flavonol and phenolic acid composition of sweet cherries (cv. Lapins) produced on six different vegetative rootstocks. *Scientia Horticulturae*, s. 23 – 28.

KITTNAR O. (2011): Lékařská fyziologie, Praha, ISBN – 978 – 80 – 247 – 3068 – 4, s. 315 – 370.

KONO Y., SASHIKO K., TAKUSHI Y., YUJI S., MATSUI Y., SHIBATA H. (1998): Iron chelation by chlorogenic acid as a natural antioxidant. *Biosci. biotechnol. biochem*, 62 (1), s. 22 – 27.

KONO Y., SHIBATA H., KODAMA Y., SAWA Y. (1995): The suppression of the N-nitrosating reaction by chlorogenic acid. *Biochemical journal* 312, s. 947 – 953.

KONO Y., SHIBATA H., KODAMA Y., UEDA A., SAWA Y. (1995): Chlorogenic acid as a natural scavenger for hypochlorous acid. *Biochemical and biophysical research communications*. Vol. 217, No. 3, s. 972 – 978.

LACHMAN J., ORSÁK M., PIVEC V., FAUSTUSOVÁ E., *Sci. Agric. Bohem.* 2000, 31, s. 89 – 99.

LINDER M. C. ED. (1991): *Nutritional biochemistry and metabolism*. New York. Elsevier.

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

MANACH C., MORAND C., TEXIER O., FAVIER M.-L., AGULL, G., DEMIGNE C., REGERAT F., REMESY C. (1995): Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *Journal of Nutrition* 125, s. 1911–1922.

PUODZIUNENE G., JANULIS V., IVANAUSHOS L., BARSTEIGENE Z., RIBOKAITE V., RAGAZINSKENE O. (2009): Medical plants: Quantitative HPLC estimation of flavonoids in showy tick trefoil herbs. *Pharmaceutical chemistry journal*, vol. 43, No. 5, s. 263 – 266.

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

SANTOS K. F. R., OLIVIERA T. T., NAGEM T. J., PINTO A. S., OLIVIERA M. G. A.,  
Pham. Res. 1999, 40, s. 493 – 436.

SASHU S.C., GRAY G.C. (1996): Pro-oxidant activity of flavonoids: effects on glutathione  
and glutathione S-transferase in isolated rat liver nuclei. Cancer Letters 104, s. 193–196.

SI-QUAN LI, ZHANH H., Crit. Rev. Food Sci. Nutr 2001, 41, 451 – 464.

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

TRNA J., TÁBORSKÁ E. (2002): Přírodní polyfenolové antioxidanty.  
[www.med.muni.cz/biochem/seminare/prirantiox.rtf](http://www.med.muni.cz/biochem/seminare/prirantiox.rtf).

VANČUROVÁ R., KUHN F. (1966): Zemědělská botanika 3, vydavatelství MÍR, publikace  
číslo 1919, s. 169, 178, 297.

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

VOLF K., ANDRS F. (2008): Flavonoidy a jejich biologické působení. Praha. AV ČR,  
C14872, s. 2 – 53.

## 10.1 Použité obrázky

Obrázek 15: Laskavec, <http://cs.wikipedia.org/wiki/Laskavec>

Obrázek 16: Pohanka Setá, [http://www2.zf.jcu.cz/~moudry/skripta/2/pohanka\\_seta.html](http://www2.zf.jcu.cz/~moudry/skripta/2/pohanka_seta.html)

Obrázek 17: Bez černý, <http://www.vseprozdravi.cz/image/cerny-bez.jpg>

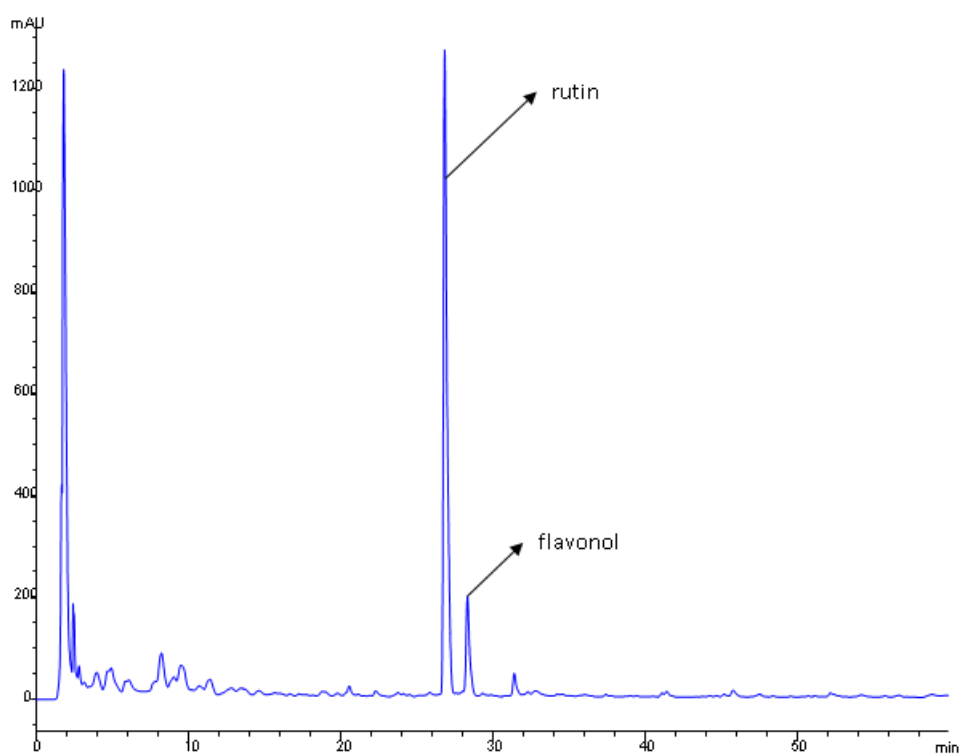
Obrázky 18 – 22: DRBAL K., KŘÍŽEK M. (1999): Analytická chemie. ZF JCU České Budějovice. ISBN 80-7040-352-7

## 11 Přílohy

Mezi přílohy jsou zařazeny chromatogramy zbylých vzorků:

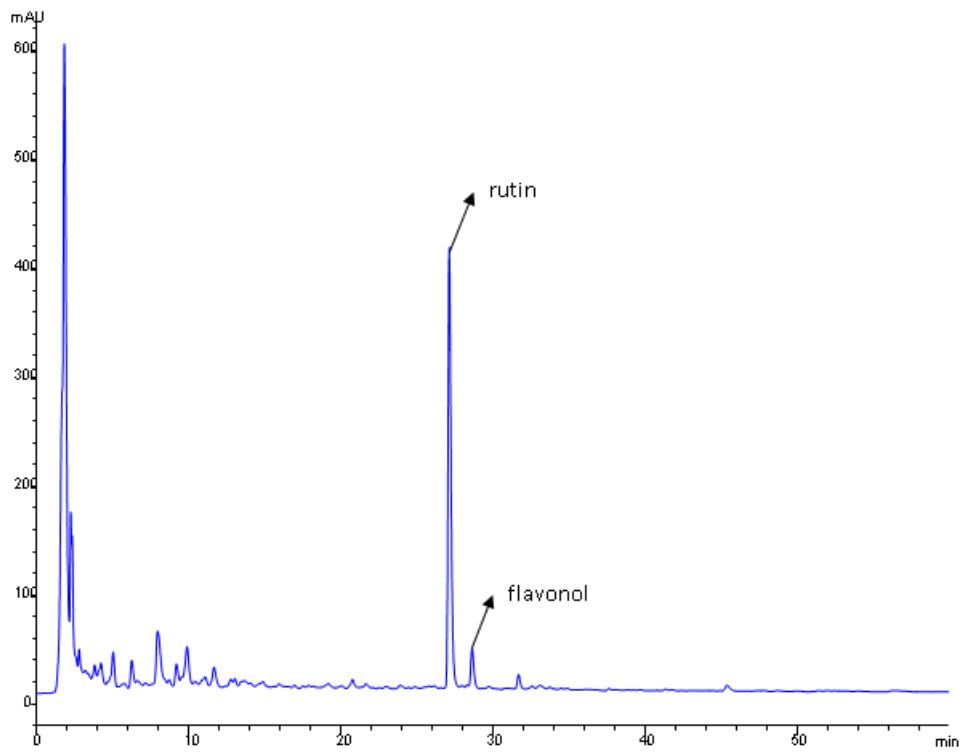
| Označení                            | Kód      |
|-------------------------------------|----------|
| bez černý bez působení              | Amar K 0 |
| bez černý po působení dvou hodin    | Amar K 2 |
| bez černý po působení čtyřech hodin | Amar K 4 |
| bez černý po působení šesti hodin   | Amar K 6 |

Chromatogram 1: Amar K 0

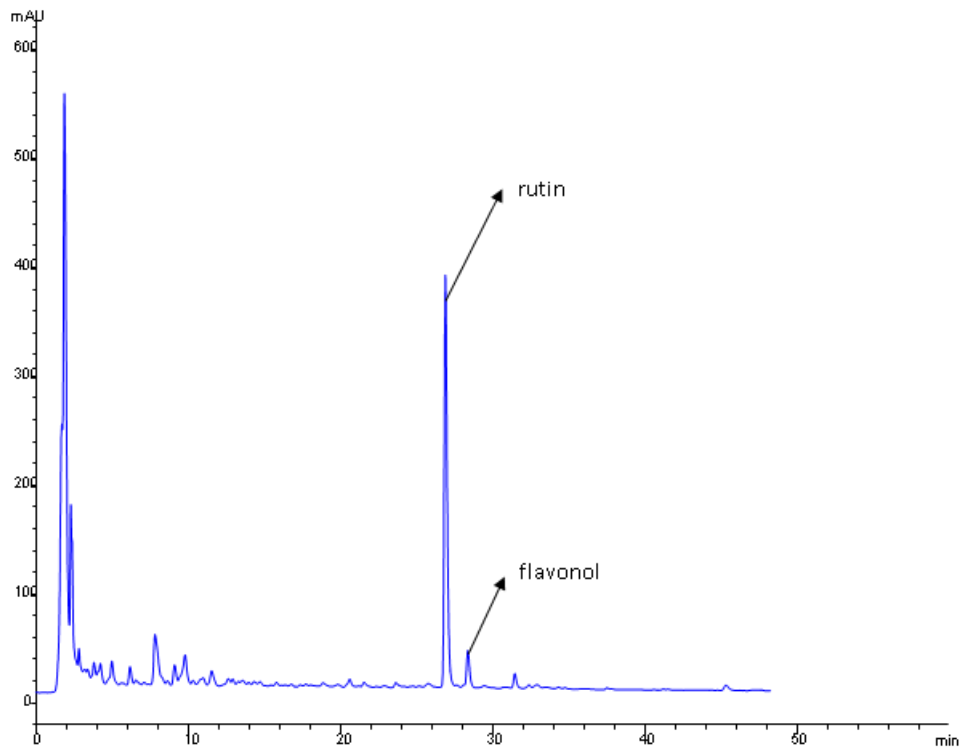




Chromatogram 2: Amar K 2

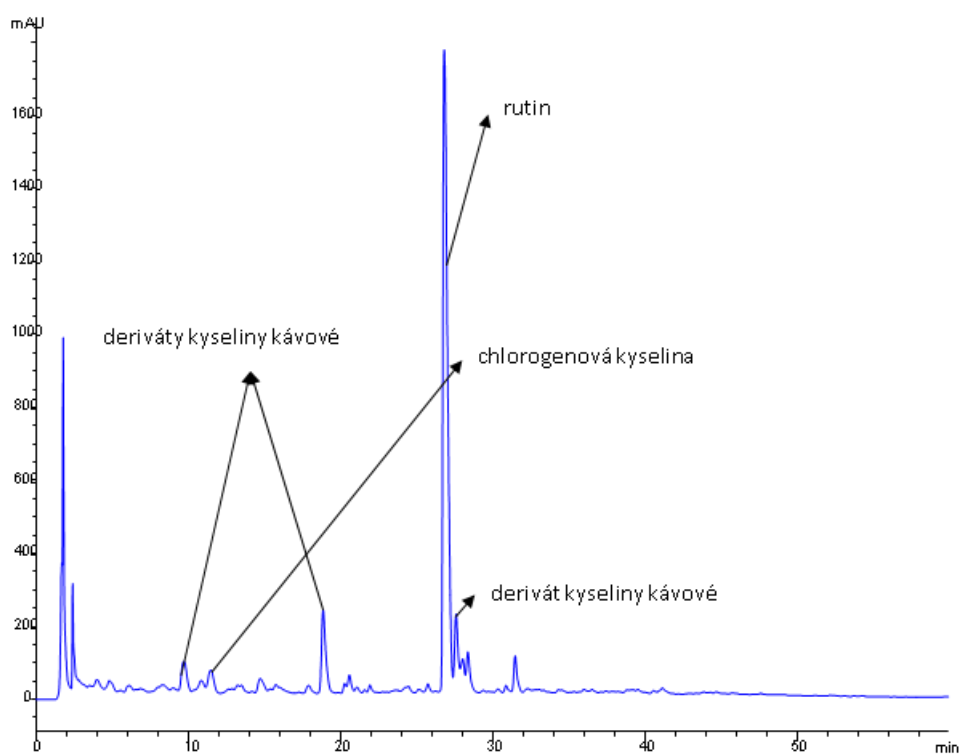


Chromatogram 3: Amar K 6

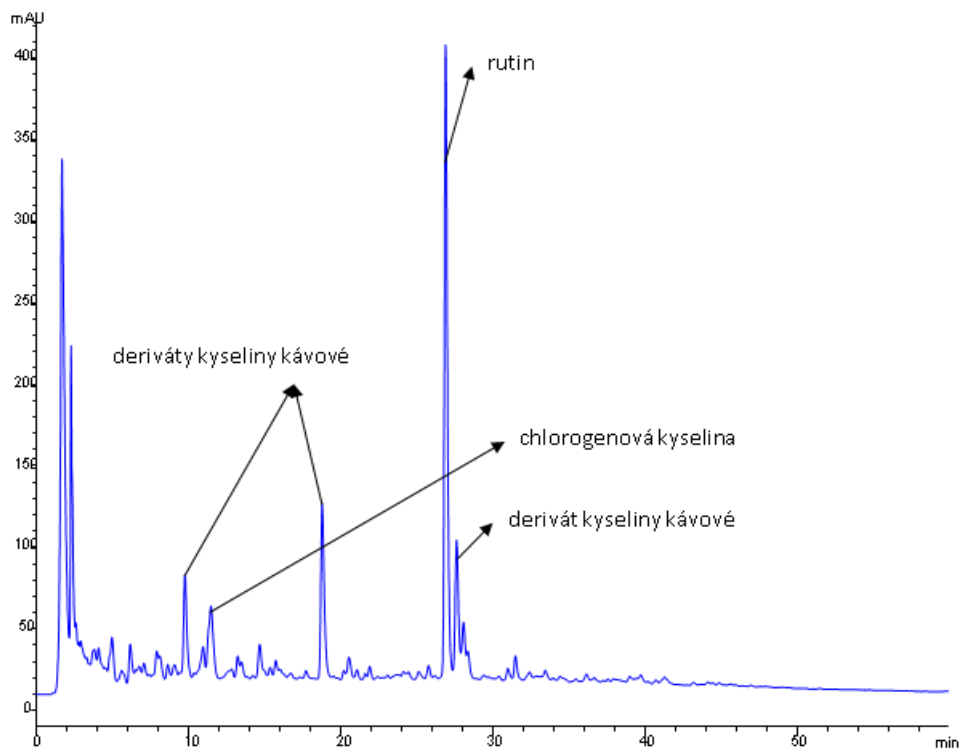


| Označení                            | Kód      |
|-------------------------------------|----------|
| bez černý bez působení              | Amar L 0 |
| bez černý po působení dvou hodin    | Amar L 2 |
| bez černý po působení čtyřech hodin | Amar L 4 |
| bez černý po působení šesti hodin   | Amar L 6 |

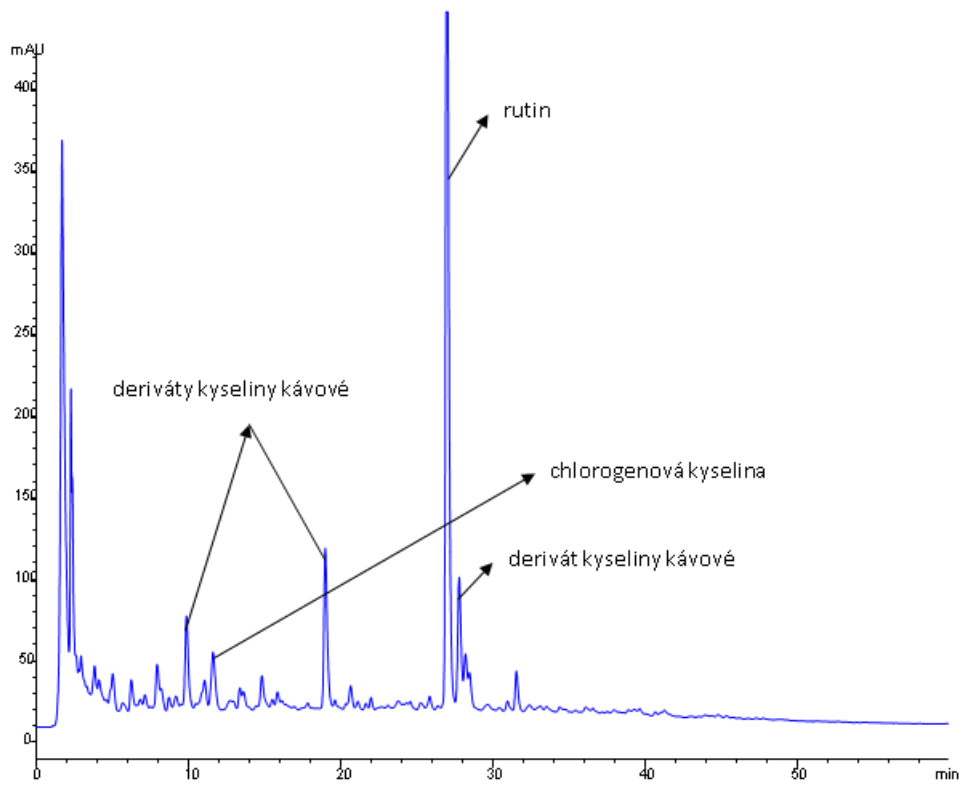
Chromatogram 4: Amar L 0



Chromatogram 5: Amar L 2

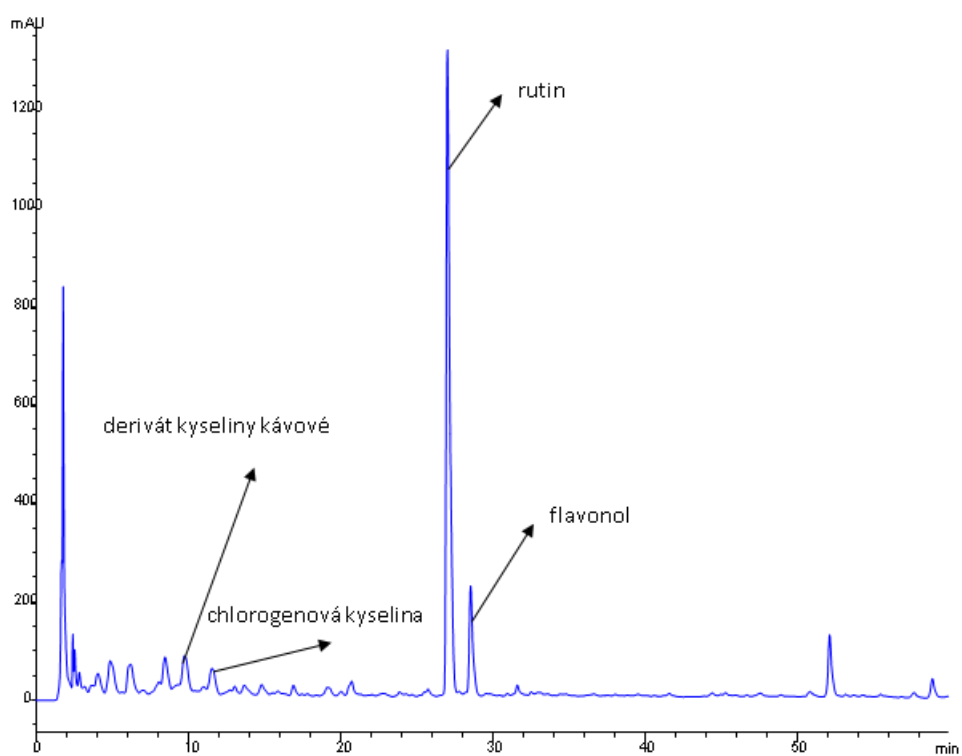


Chromatogram 6: Amar L 6

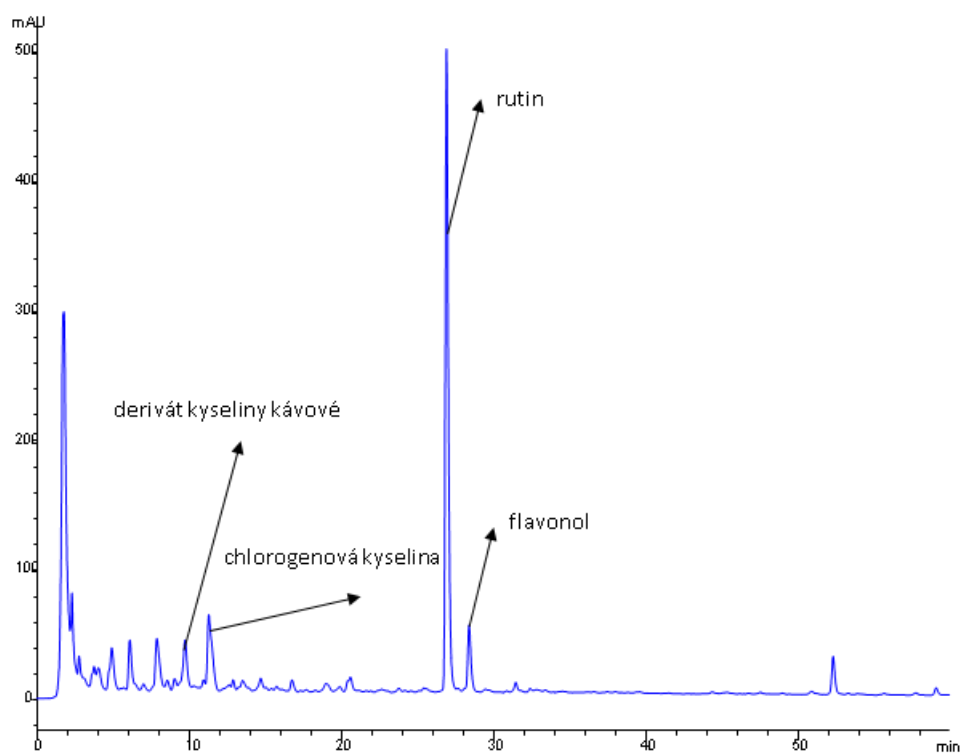


| Označení                            | Kód       |
|-------------------------------------|-----------|
| bez černý bez působení              | Koniz K 0 |
| bez černý po působení dvou hodin    | Koniz K 2 |
| bez černý po působení čtyřech hodin | Koniz K 4 |
| bez černý po působení šesti hodin   | Koniz K 6 |

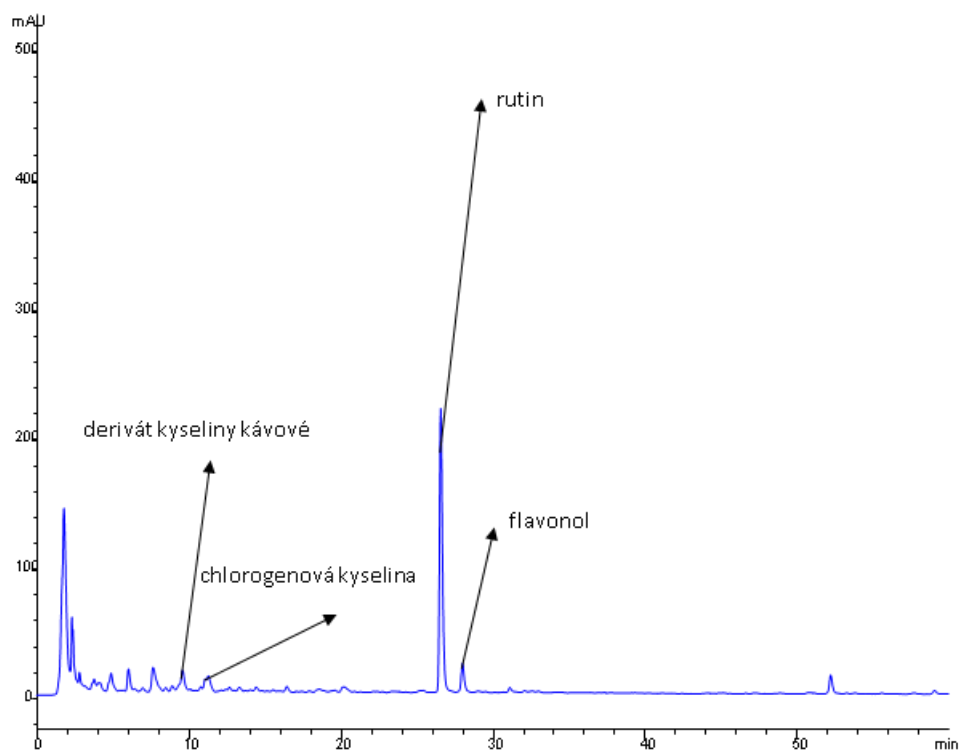
Chromatogram 7: Koniz K 0



Chromatogram 8: Koniz K 2

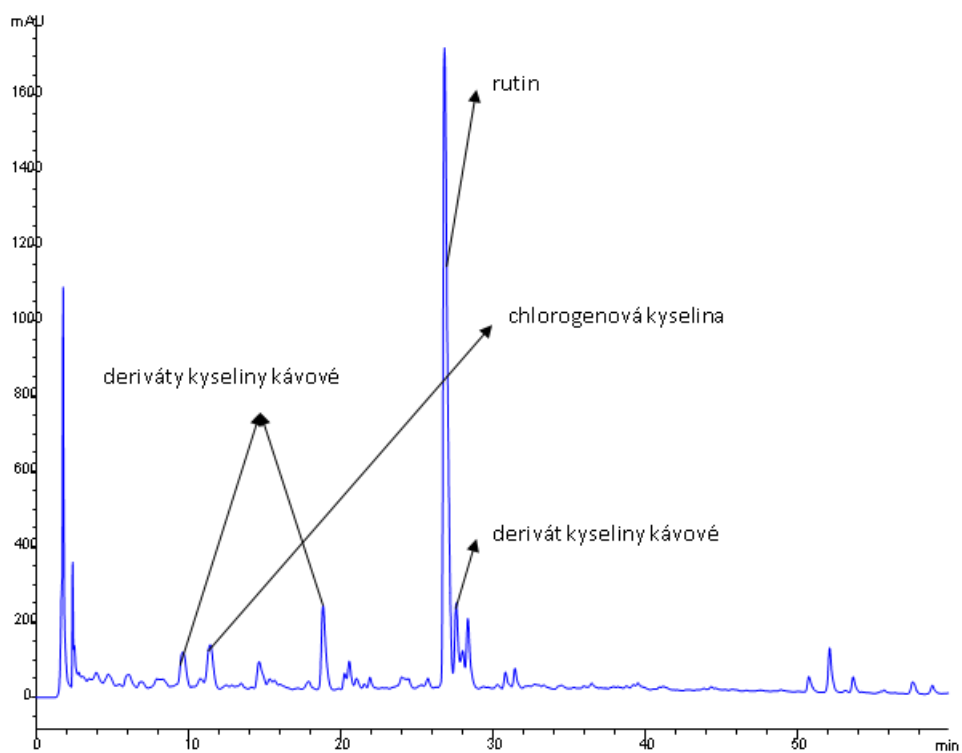


Chromatogram 9: Koniz K 6

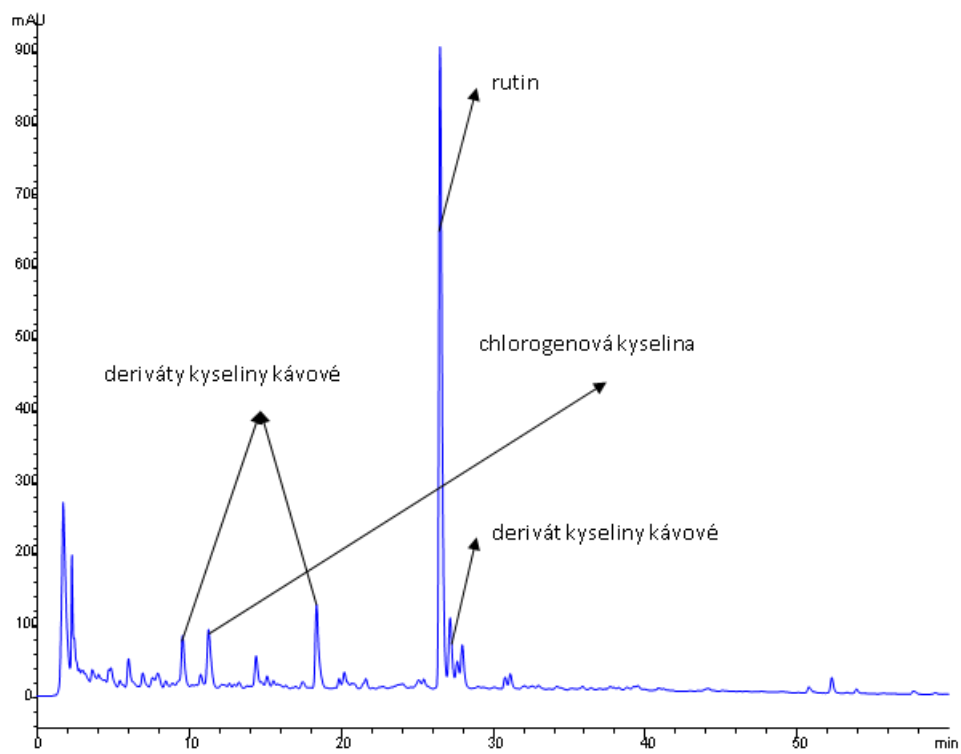


| Označení                            | Kód       |
|-------------------------------------|-----------|
| bez černý bez působení              | Koniz L 0 |
| bez černý po působení dvou hodin    | Koniz L 2 |
| bez černý po působení čtyřech hodin | Koniz L 4 |
| bez černý po působení šesti hodin   | Koniz L 6 |

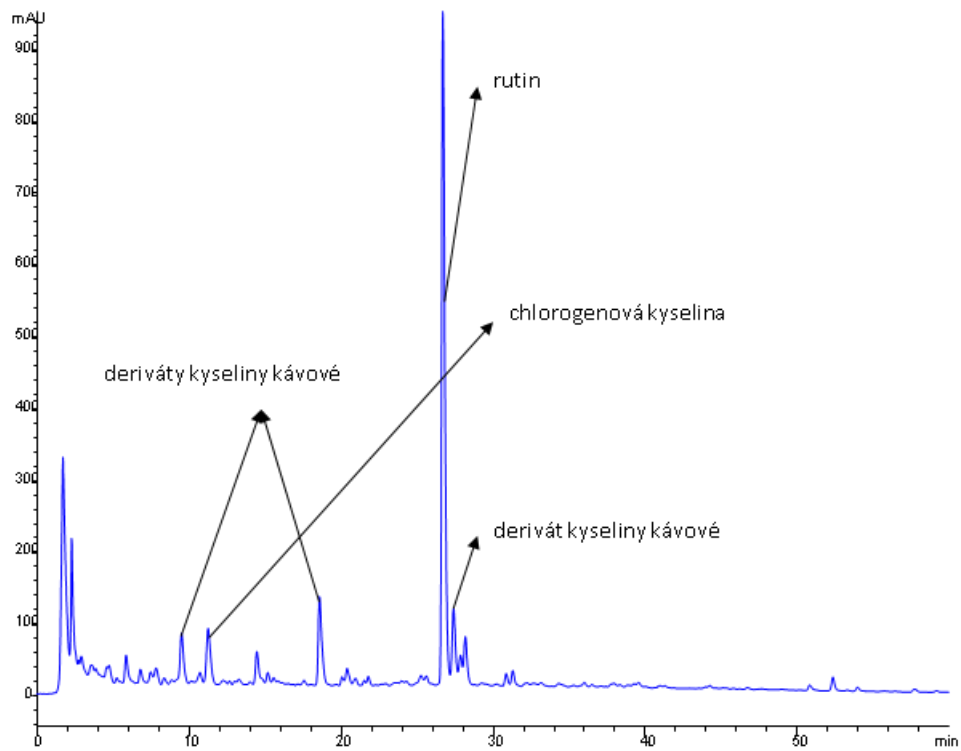
Chromatogram 10: Koniz L 0



Chromatogram 11: Koniz L 2

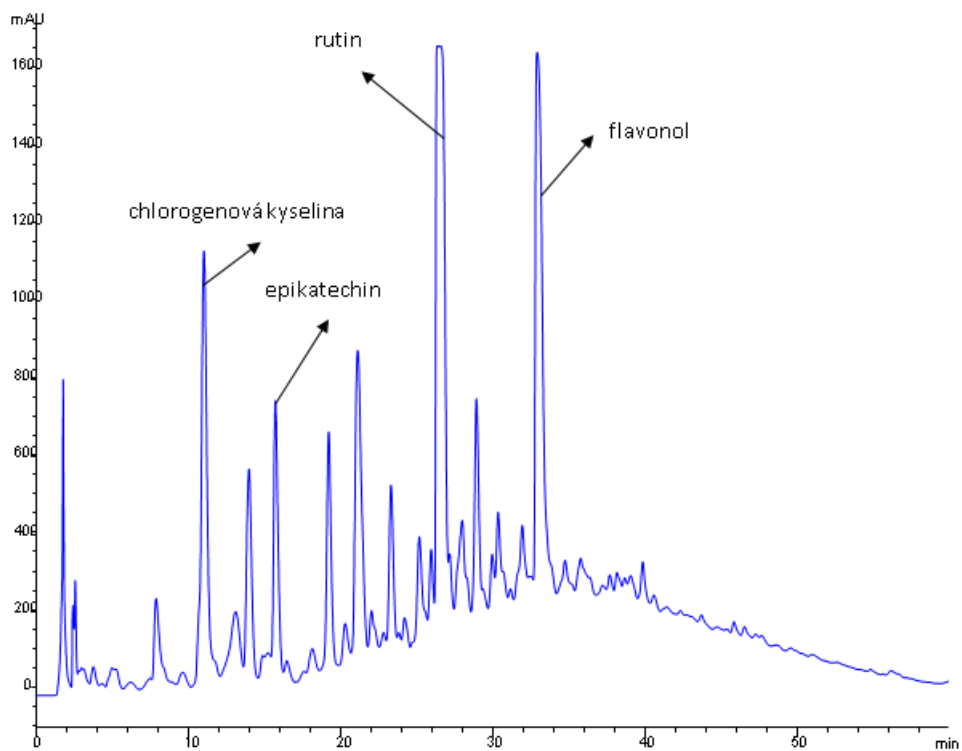


Chromatogram 12: Koniz L 6



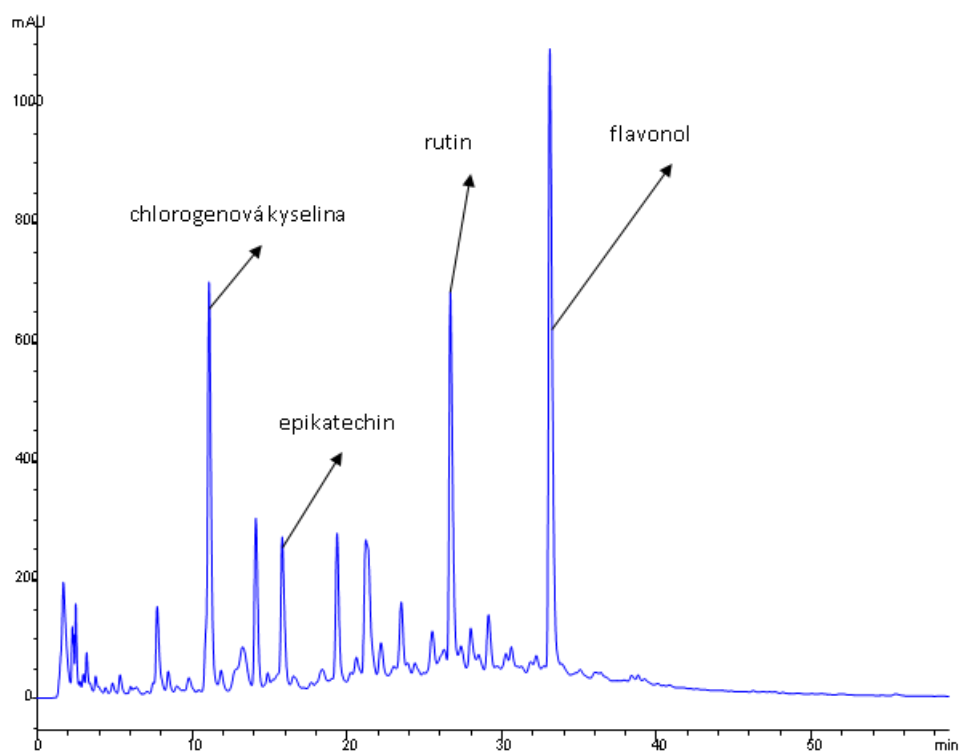
| Označení                            | Kód      |
|-------------------------------------|----------|
| bez černý bez působení              | Pyra K 0 |
| bez černý po působení dvou hodin    | Pyra K 2 |
| bez černý po působení čtyřech hodin | Pyra K 4 |
| bez černý po působení šesti hodin   | Pyra K 6 |

Chromatogram 13: Pyra K 0

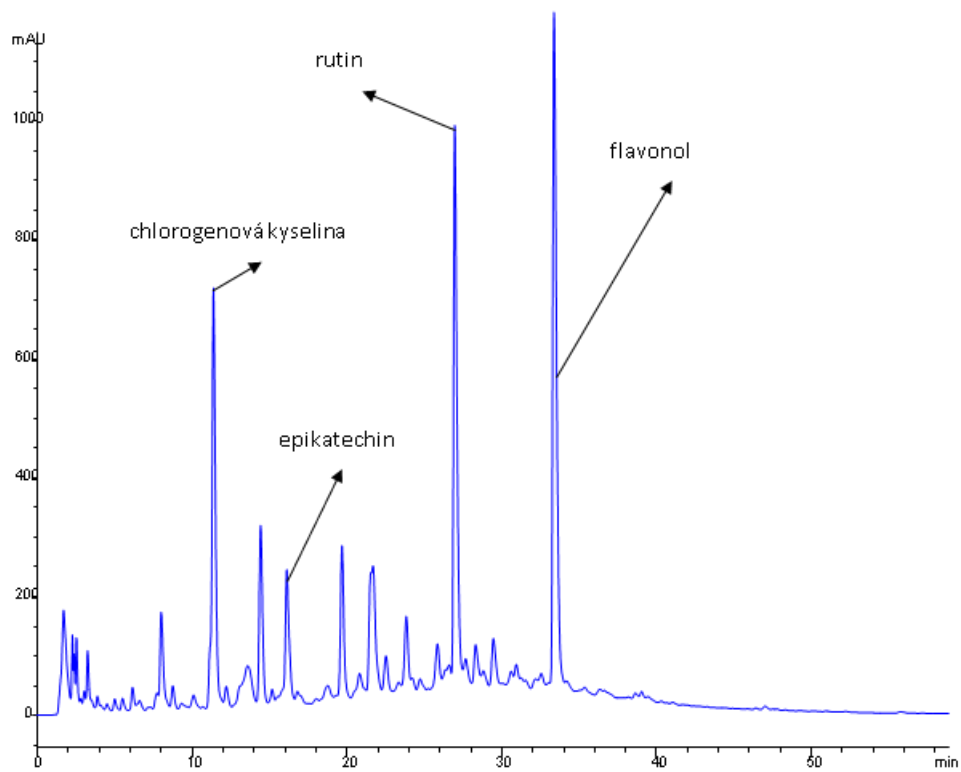




Chromatogram 14: Pyra K 2

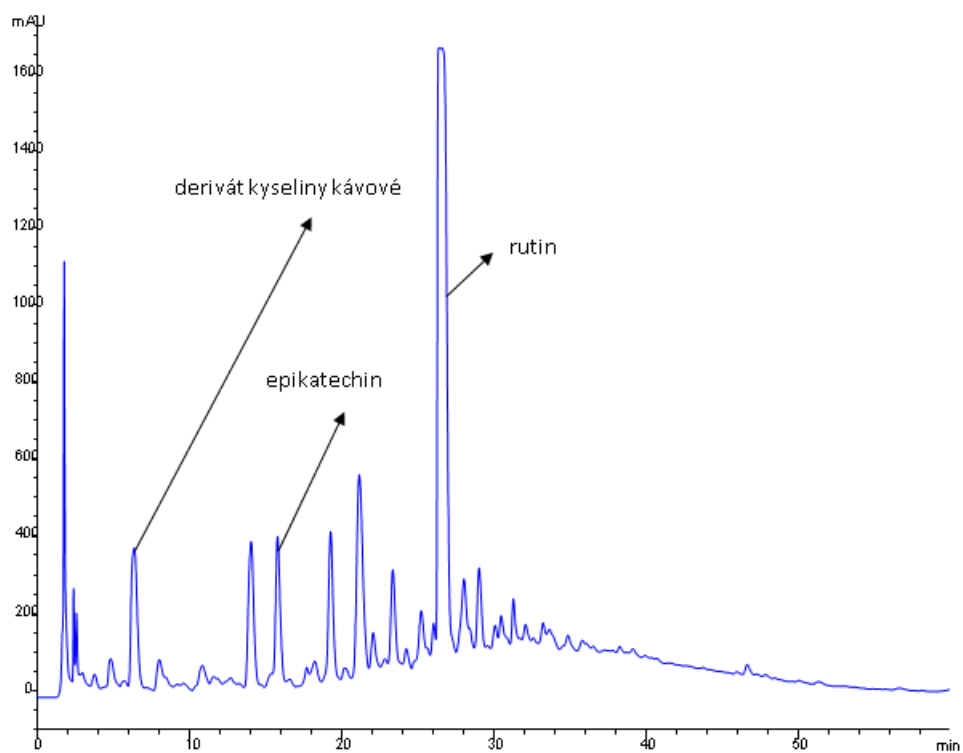


Chromatogram 15: Pyra K 6

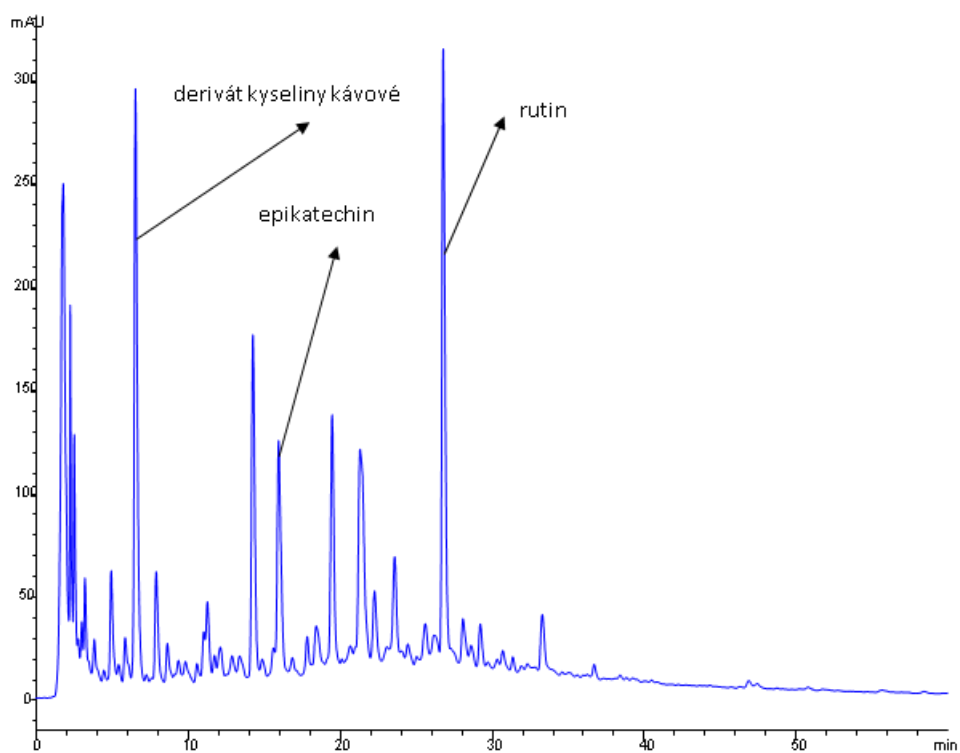


| Označení                            | Kód      |
|-------------------------------------|----------|
| bez černý bez působení              | Pyra L 0 |
| bez černý po působení dvou hodin    | Pyra L 2 |
| bez černý po působení čtyřech hodin | Pyra L 4 |
| bez černý po působení šesti hodin   | Pyra L 6 |

Chromatogram 16: Pyra L 0



Chromatogram 17: Pyra L 2



Chromatogram 18: Pyra L 6

