

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH
BUDĚJOVICÍCH**

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA



DISERTAČNÍ PRÁCE

Vývoj metodiky stanovení významných flavonoidů a její aplikace na
vybrané zemědělské plodiny

Ing. Eva Dadáková

Školitel : doc. Ing. Martin Křížek, CSc.
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta

Ráda bych poděkovala vedoucímu disertační práce doc. Ing. Martinu Křížkovi, CSc. za cenné rady a připomínky, s kterými mě při práci vedl a Ing. Tamaře Pelikánové za pomoc při zpracování vzorků.

Dále děkuji všem pracovníkům katedry chemie JU ZF za vytvoření příjemné a tvůrčí atmosféry pro moji práci.

Chtěla bych též poděkovat kolektivu katedry chemie ČZU v Praze – Suchdole za provedení srovnávacích analýz.

Tato práce byla vypracována za podpory projektů IG ZF JU č. 02/00, IG ZF JU č. 02/01, IG ZF JU č. 12/02, MSM 6007665806 a GAČR 525/05/2546.

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně na základě vlastních zjištění a za pomoci uvedené literatury.

V Českých Budějovicích 6.4.2006

1. Obsah

1.	OBSAH	1
	SEZNAM ZKRATEK	4
	SOUHRN	5
	SUMMARY	8
2.	ÚVOD	11
3.	TEORETICKÁ ČÁST	12
3.1.	Biosyntéza a výskyt flavonoidních látek	12
3.2.	Vlastnosti	14
3.3.	Význam flavonoidů	17
3.4.	Výživové zdroje flavonoidů	20
3.5.	Ovoce a zelenina	21
3.6.	Nápoje	22
3.7.	Pohanka	23
3.8.	Ostatní zdroje flavonoidů	23
3.9.	Analýza flavonoidů	24
3.9.1.	Vzorkování.....	26
3.9.2.	Izolace látek z materiálu.....	27
3.9.3.	Analýza glykosidů.....	27
3.9.4.	Analýza aglykonů.....	29
3.9.5.	Analytická koncovka.....	31
3.9.5.1.	HPLC	31
3.9.5.2.	CZE a MECC.....	32
3.9.5.3.	Ostatní metody.....	34
4.	CÍLE PRÁCE	35
5.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	36
5.1.	Vzorkování	36
5.1.1.	Ovoce a zelenina	36
5.1.2.	Vliv vybraných kuchyňských úprav na obsah kvercetin v cibuli	36
5.1.2.1.	Obsah kvercetin v základních odrůdách cibule kuchyňské.....	37
5.1.2.2.	Vzorkování sušic cibule	37
5.1.2.3.	Skladování cibule.....	37
5.1.2.4.	Tepelné úpravy cibule.....	38
5.1.3.	Vliv vybraných kuchyňských úprav na obsah kvercetin v plodech bezu černého	38
5.1.3.1.	Příprava šťávy a okyselené šťávy.	39
5.1.3.2.	Příprava džemu a okyseleného džemu	39
5.1.4.	Skladování džemů	39
5.1.5.	Příprava kontrolního materiálu	39
5.1.6.	Obsah rutinu v několika odrůdách pohanky seté a pohanky tatarky (<i>Fagopyrum esculentum</i> Moench, <i>Fagopyrum tataricum</i> (L.) Gaertn.)	40

5.1.7.	Léčivé a jiné užitkové rostliny	40
5.1.7.1.	Bez černý (<i>Sambucus nigra</i> L.)	41
5.1.7.2.	Příprava nápojů z květenství bezu černého	42
5.1.7.2.1.	Příprava šumivého nápoje	42
5.1.7.2.2.	Příprava vína	42
5.1.7.2.3.	Příprava čaje	42
5.1.7.3.	Rozdělení květenství na jednotlivé části	43
5.1.7.4.	Sušení černého bezu při různých podmínkách	43
5.1.7.5.	Dlouhodobé skladování bezu černého	43
5.1.7.6.	Křídlatka (<i>Reynoutria</i> <i>ssp.</i>)	44
5.1.8.	Nápoje	44
5.1.8.1.	Čaje	44
5.1.8.2.	Ostatní nápoje	45
5.2.	Lyofilizace a homogenizace	45
5.3.	Uchovávání vzorků	45
5.4.	Použité analytické metody	46
5.5.	Použité statistické metody	46
5.6.	Použité chemikálie	46
5.6.1.	Použité chemikálie a materiál	46
5.6.2.	Použité přístroje a zařízení	47
5.7.	Pracovní podmínky SpectraPhoresis 2000	47
5.7.1.	Údržba kapiláry	48
5.7.2.	Příprava pracovních pufků	48
5.7.3.	Stanovení a úprava pH	49
6.	VÝSLEDKY A DISKUSE	50
6.1.	Vývoj metody	50
6.1.1.	Výběr a optimalizace analytické koncovky	52
6.1.1.1.	Volba přístroje	52
6.1.1.2.	Volba a optimalizace pracovního elektrolytu	52
6.1.1.2.1.	Nastavení hodnoty pH základního pufru	52
6.1.1.2.2.	Přídavek nevodného rozpouštědla do základního pufru	55
6.1.1.2.3.	SDS v pracovním elektrolytu	56
6.1.1.3.	Volba optimální pracovní vlnové délky detektoru	57
6.1.1.4.	Volba vnitřního standardu	58
6.1.2.	Hydrolyza	60
6.1.2.1.	Použití antioxidantu	61
6.1.3.	Vývoj a optimalizace extrakčního procesu	61
6.1.3.1.	Optimalizace délky doby extrakce	61
6.1.4.	Zakoncentrování a přečištění	63
6.1.4.1.	Filtrace zbytků vzorku	64
6.1.4.2.	Extrakce nemísitelnou kapalinou	64
6.1.4.3.	Odstředování	65
6.1.4.4.	Filtrace	66
6.1.4.5.	Optimalizace metody SPE	67
6.1.4.5.1.	Volba typu SPE kolonek	68
6.1.4.5.2.	Obsah methanolu	69
6.1.4.5.3.	Hodnota pH	70
6.1.4.5.4.	Testování kolonek Strata-X (Phenomenex Inc., USA)	71
6.1.5.	Optimalizované pracovní postupy	72
6.1.5.1.	Stanovení obsahu celkového kvercetinu	72
6.1.5.2.	Stanovení obsahu celkového kvercetinu v nápojích	73
6.1.5.3.	Stanovení rutinu	74
6.1.6.	Způsob vyhodnocení	74
6.1.7.	Stanovení základních statistických parametrů metody	76
6.1.7.1.	Nejistota měření	78

6.1.7.2.	Hodnocení dlouhodobé stability analytického systému	79
6.1.7.3.	Mezilaboratorní srovnání	80
6.2.	Měření obsahu kvercetinu a rutinu v různých rostlinných materiálech	80
6.2.1.	Obsah celkového kvercetinu v souboru ovoce a zeleniny	81
6.2.2.	Kuchyňské úpravy zeleniny	84
6.2.2.1.	Obsah celkového kvercetinu ve vybraných odrůdách cibule	84
6.2.2.2.	Obsah kvercetinu v jednotlivých suknicích cibule.....	84
6.2.2.3.	Dlouhodobé skladování cibule.....	86
6.2.2.4.	Tepelné úpravy cibule.....	87
6.2.3.	Kuchyňské úpravy ovoce	87
6.2.3.1.	Změny obsahu celkového kvercetinu při kuchyňských úpravách	88
6.2.4.	Stanovení obsahu rutinu v pohance.....	89
6.2.5.	Stanovení obsahu hlavních fenolických látek květu bezu černého	91
6.2.5.1.	Distribuce hlavních fenolických látek v jednotlivých částech květenství.....	93
6.2.5.2.	Obsah fenolických látek v nápojích z bezu černého	94
6.2.5.3.	Sušení bezu při různých podmínkách a dlouhodobé skladování.....	94
6.2.6.	Obsah celkového kvercetinu v křídlatce	96
6.2.7.	Obsah celkového kvercetinu v nápojích	96
6.2.8.	Obsah kvercetinu v červeném víně.	98
6.2.9.	Obsah celkového kvercetinu v čaji	100
7.	ZÁVĚR.....	103
8.	SEZNAM LITERATURY	106
9.	SEZNAM PUBLIKACÍ.....	114
9.1.	Původní práce.....	114
9.2.	Práce prezentované na konferencích	114
9.3.	Grantové projekty.....	115
10.	PŘÍLOHY	116

Seznam zkratek

CZE	kapilární zónová elektroforéza
DAD	detektor s diodovým polem
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LDL	lipoproteiny s nízkou hustotou
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
RP	reverzní fáze
RSD	relativní směrodatná odchylka
SDS	sodiumdodecylsulfate, laurylsíran sodný
TBHCH	t-butylhydrochinon
TLC	chromatografie na tenké vrstvě

Souhrn

Jak ukazují výzkumy z posledního desetiletí, přírodní flavonoidy mohou efektivně přispívat k prevenci onemocnění srdce a cév, které se řadí mezi tzv. civilizační choroby. Flavonol kvercetin představuje významnou fenolickou látku, jejíž obsah zejména v ovoci a zelenině je v poměru k ostatním zástupcům skupiny flavonolů vysoký. Stává se tak každodenní součástí lidského jídelníčku. V některých rostlinných druzích se kvercetin vyskytuje ve velkém množství vázaný v glykosidu rutinu (kvercetin-3-O-D-rutinosid). Tato látka, která je již dlouho farmaceuticky využívaná, se ve velkém množství nachází například v pohance seté.

Práce byla zaměřena na kvercetin a rutin jako významné zástupce výživově cenných flavonoidů. Pro zhodnocení obsahu sledovaných analytů bylo potřeba sestavit spolehlivou analytickou metodu. Pro kvantitativní analýzu kvercetinu a rutinu s využitím kapilární elektroforézy bylo optimalizováno složení pracovního pufru a byl vypracován postup hydrolýzy a extrakce rostlinného materiálu, po které následovaly přečištění a zakoncentrování vzorku před vlastní analytickou koncovkou. Jako výsledek optimalizace analytického postupu byly sestaveny tři samostatné postupy. Metoda pro stanovení obsahu celkového kvercetinu v rostlinném materiálu má mez stanovitelnosti 10 mg/kg lyofilizovaného materiálu a je vhodná pro rostlinný materiál s obsahem kvercetinu v rozmezí 10-200 mg kvercetinu na kilogram lyofilizovaného materiálu. Metoda pro stanovení obsahu celkového kvercetinu v nápojích má mez stanovitelnosti 2 mg/l nápoje a je vhodná pro nápoje s obsahem kvercetinu v rozmezí 10-200 mg kvercetinu v litru výrobku. Metoda pro stanovení rutinu má mez stanovitelnosti 10 mg/kg lyofilizovaného materiálu a je vhodná pro rostlinný materiál s obsahem rutinu v rozmezí 10-4000 mg rutinu na kilogram lyofilizovaného materiálu. Pro všechny sestavené metody byla odhadnuta hodnota rozšířené nejistoty měření, která činí 15 % pro všechny metody. Tyto metody byly používány pro stanovení obsahu sledovaných látek ve vybraných materiálech.

Pro stanovení obsahu celkového kvercetinu byl sestaven soubor 15 druhů zeleniny a 14 druhů ovoce běžně pěstovaných v České republice. Mezi těmito vzorky zeleniny bylo nalezeno sedm druhů s obsahem celkového kvercetinu pod mezí stanovitelnosti metody. Byl stanoven vysoký obsah celkového kvercetinu v červené

paprice (138 mg/kg), žluté cibuli (359 mg/kg) a červené cibuli (610 mg/kg). Mezi analyzovanými druhy ovoce byl pouze jeden druh (angrešt), který měl obsah celkového kvercetinu pod mezí stanovitelnosti metody. Vysoký obsah celkového kvercetinu byl nalezen u višně (75,4 mg/kg), jeřábu červeného (108 mg/kg) a bezinek (307 mg/kg). Podle srovnání získaných výsledků s obdobnými daty získanými metodou využívající HPLC dosahuje metoda, vyvinutá v rámci této práce, dobré shody.

Při analýze obsahu celkového kvercetinu v jednotlivých suknicích cibule kuchyňské byl největší obsah nalezen v suchých suknicích, které se bohužel kuchyňsky nevyužívají. Obsah kvercetinu klesá směrem do středu cibule.

Při dlouhodobém skladování cibule kuchyňské při 6 °C a 22 °C trvajícím 6 měsíců klesal obsah celkového kvercetinu zhruba na polovinu výchozího obsahu bez ohledu na podmínky skladování. Při pečení nakrájené cibule po dobu 5, 10 a 15 minut se obsah celkového kvercetinu nesnížil.

Zpracování plodů bezu černého na šťávu použitým způsobem způsobilo ztrátu obsahu celkového kvercetinu o 50 % z původního obsahu v plodech.

Obsah rutinu byl stanovován v letech 2001 až 2003 v souboru materiálů pěti odrůd pohanky seté a v roce 2003 v materiálu z pohanky tatarky. Z každé odrůdy byly získány čtyři druhy vzorků: květy, listy, stonky a nažky. Bylo potvrzeno, že největší obsah rutinu obsahují vzorky listů a květů u všech odrůd, nejnižší obsah rutinu byl nalezen v nažkách. Rozdíly v obsahu rutinu mezi jednotlivými odrůdami pohanky seté a mezi roky pěstování těchto odrůd nebyly statisticky významné. Nažky pohanky tatarky obsahovaly okolo 20 g rutinu v kg sušiny, což je zhruba stokrát více než u nažek pohanky seté.

Květenství bezu černého obsahuje jako hlavní flavonoid rutin. V analyzovaném materiálu byl nalezen obsah rutinu dosahující hodnot 17,7 g v kg v lyofilizované sušiny, což odpovídá publikovaným údajům. Bylo zjištěno, sušení květenství při teplotě 22 °C nesnížilo významně obsah rutinu ve srovnání s lyofilizovaným materiálem.

Při sušení květenství bezu černého při třech různých teplotách (22 °C, 30 °C a 50 °C) došlo k největšímu poklesu obsahu rutinu u nejvyšší použité teplotě. Při dlouhodobém skladování květenství bezu sušeného při třech různých teplotách docházelo k poklesu obsahu rutinu ve všech případech přibližně o 20 %.

Analýza nápojů připravených z květenství bezu černého přinesla informace o obsahu volného kvercetinů v těchto materiálech. Volný kvercetin byl přítomen ve fermentovaných nápojích, nikoliv v čaji připraveném ze sušeného květenství.

U všech analyzovaných druhů křídlatky byl nalezen vysoký obsah celkového kvercetinů. Nejvyšší obsah obsahovaly květy křídlatky sachalinské (až 19,5 g v kg sušiny). Křídlatka česká měla ze všech analyzovaných druhů obsah celkového kvercetinů nejnižší ve všech analyzovaných částech rostliny.

U analyzovaných jablečných nápojů obsah celkového kvercetinů stoupal s rostoucím obsahem ovocné složky. U analyzovaných nápojů z černého rybízu, u kterých byl deklarovaný obsah ovocné složky menší než 20 %, byl obsah celkového kvercetinů pod mezí stanovitelnosti metody. Analyzované pivo světlé výčepní mělo obsah celkového kvercetinů nižší (6,5 mg/l) než světlý ležák (7,9 mg/l). U tmavého piva byl obsah celkového kvercetinů pod mezí stanovitelnosti metody.

Obsah celkového kvercetinů byl stanoven u červených moravských vín vyrobených v rocích 2000 a 2001. U analyzovaných vzorků byl nalezen volný kvercetin v množství 10 % až 49 % celkového obsahu kvercetinů. Obsah celkového kvercetinů byl vyšší u vín z roku 2000.

Analyzované pravé čaje obsahovaly celkový kvercetin v rozmezí 1360 až 3720 mg celkového kvercetinů v kg čaje. Čaj roibois měl obsah 2200 mg/kg, bylinný čaj 2850 mg/kg a ovocný čaj 624 mg/kg. Bylo zjištěno, že při přípravě nápoje obvyklým způsobem z čajové dávky 1,5 g přešlo do roztoku u pravých čajů 41,6 % až 77,9 % obsahu celkového kvercetinů přítomného v čajové dávce. U bylinného a ovocného čaje přešel do roztoku veškerý kvercetin.

Summary

It has been shown in the last decade that natural flavonoids can effectively contribute to the prevention of vascular and cardiac diseases. The flavonol quercetin represents an important phenolic substance with high-level content especially in fruits and vegetables, compared to the level of other flavonols. Thus quercetin is a part of the human daily diet. Some plant species contain high amounts of the quercetin bound to the glycoside rutin (quercetin-3-O-D-rutinoside). Rutin has been used in pharmacology for a long time and can be found in high amounts in *Fagopyrum esculentum*.

This thesis orients on analysis of quercetin and rutin as important representatives of dietary valuable flavonoids. The reliable analytical method to evaluate the content of the monitored substances had to be developed. Capillary electrophoresis was used to quantify the amount of quercetin and rutin. The working buffer composition was optimized and the procedure for hydrolysis and extraction of plant material was developed. Samples were purified and concentrated before capillary electrophoresis analysis. Optimization of the whole analytical procedure resulted in the development of three independent methods. A method for the analysis of the content of total quercetin in plant material has a detection limit of 10 mg/kg lyophilized material and is suitable for plant material with quercetin content within 10-200 mg per kilogram of lyophilized material. A method for the analysis of the content of total quercetin in drinks has a detection limit of 2mg/ml and is suitable for drinks with quercetin content within 10-200 mg per liter of liquid. A method for the analysis of rutin has a detection limit of 10 mg/kg lyophilized material and is suitable for plant material with rutin content within 10-4000 mg rutin per kilogram of lyophilized material. The measurement uncertainty was estimated as 15 % for all developed methods. The methods mentioned here were used to analyze the content of monitored substances in chosen materials.

To analyze the content of total quercetin, a list of 15 species of vegetables and 14 species of fruits commonly produced in Czech republic was made. The content of total quercetin for seven vegetable species was below detection limit. High content of total quercetin was found in red paprika (138 mg/kg), yellow onion (359 mg/kg) and red onion (610 mg/kg). Only one of the analyzed fruit species, goose-berry, had a content of total quercetin below detection limit. High content of total quercetin was found in sour

cherries (75,4 mg/kg), rowanberries (108 mg/kg) and elder-berries (307 mg/kg). These results are in a good agreement with previously published data obtained with the HPLC method.

The content of total quercetin in individual onion layers was analyzed. The highest content of total quercetin was found in dry layers, which have unfortunately no culinary use. The content of total quercetin was found to decline towards the middle of the onion.

The content of total quercetin in onion was analyzed during long-term storage at 6 °C and 22 °C for 6 months and during baking for 5, 10 and 15 minutes. The content of total quercetin in onion declined to the half of the initial amount regardless of the storage conditions. No decrease in content of total quercetin was recorded during baking.

The total quercetin in elder-berries after juice processing dropped by 50 % of that in fresh fruits.

The content of rutin was analyzed in 5 different varieties of *Fagopyrum esculentum* during seasons 2001 – 2003 and from *Fagopyrum tataricum* during season 2003. Samples were obtained from flowers, leaves, stems and achenes of each variety. The results confirmed that highest content of rutin can be found in leaves and flowers for each variety. The lowest content of rutin is found in achenes. No statistically significant differences were found in content of rutin among different varieties of *Fagopyrum esculentum* or among seasons. Achenes of tatarka contained around 20 g of rutin per kg, which is approximately hundred times more than in the achenes of *Fagopyrum esculentum*.

Rutin is the main flavonoid in inflorescence of *Sambucus nigra*. Its content in the analyzed material reached 17,7 g/kg lyophilized dry mass, which is consistent with values shown elsewhere. It was found that drying of inflorescence in 22 °C does not reduce the rutin content compared to the lyophilized material.

The inflorescence was dried using three different temperatures 22 °C, 30 °C and 50 °C. The highest reduction in rutin content was observed using the highest temperature. The content of rutin declined by approximately 20 % during long-term storage of inflorescence in all three different temperatures.

Analysis of drinks prepared from inflorescence of *Sambucus nigra* allowed us to acquire information about content of free quercetin in such materials. Free quercetin was found preferably in fermented drinks. The tea prepared from dry inflorescence did not contain any free quercetin.

High content of total quercetin was found in all analyzed species of *Reynoutria*. The flowers of *Reynoutria sachalinensis* contained the highest content of about 19,5 g/kg of dry mass. The lowest content of total quercetin among *Reynoutria* species was found in *Reynoutria x bohemica* and was low in all analyzed parts.

Content of total quercetin increased together with increasing proportion of fruit component in analyzed apple drinks. Content of total quercetin was below detection limit in analyzed elder-berry drinks with a declared proportion of fruit component of less than 20 %. Content of total quercetin in analyzed light draught beer was lower (6,5 mg/l) than in analyzed light stock beer (7,9 mg/l). Content of total quercetin in dark beer was found below detection limit.

Content of total quercetin was analyzed in red Moravian wines produced in years 2000 and 2001. Amount of free quercetin found in analyzed samples ranging from 10 % to 49 % of the total content of quercetin. Content of total quercetin was higher in wines produced in year 2000.

Real teas contained total quercetin within range 1360 – 3720 mg of total quercetin in kg of tea. Values for roibos tea, herb tea and fruit tea were 2200 mg/kg, 2850 mg/kg and 624 mg/kg respectively. The common way of preparing real tea was found to release from 41,6 % to 77,9 % of total quercetin content present in tea dose (1,5 g). Herb and fruit teas released all of its quercetin content.

2. Úvod

Flavonoidy patří mezi přírodní látky výhradně rostlinného původu, u kterých byly objeveny významné biologické účinky. Tyto látky polyfenolického charakteru působí jako účinné antioxidanty, vycytávají volné radikály, dovedou vázat prooxidační kovové ionty, zejména železa a mědi do nereaktivních chelátů. Společně s vitamínem C, vitamínem E, kyselinou lipoovou, karoteny, glutathionem a dalšími látkami vytvářejí antioxidační kapacitu systému. Uvádí se, že flavonoidy omezují růst patogenních bakterií a virů, působí protizánětlivě a zlepšují stav vlasečnic a žil (Cook a Samman, 1996).

Funkce flavonoidů jako účinných antioxidantů se projevuje při ochraně krevních lipidů před oxidací. Při oxidaci lipidů výrazně roste riziko vzniku onemocnění srdce a cév, které může vyústit v infarkt nebo mozkovou mrtvici (Pánek et al., 2002). Pokud potrava obsahuje dostatečné množství přirozených antioxidantů z ovoce a zeleniny, je úroveň oxidace krevních lipidů snížena. Výrazný pokles onemocnění srdce a cév navzdory vysokému příjmu živočišných tuků byl pozorován hlavně ve Francii a státech ležících kolem Středozevního moře, což vedlo k označení této výživové anomálie jako „Francouzský paradox“ (Formica a Regelson, 1995, Stanley a Maizer, 1999). Přímý vztah mezi příjmem flavonoidů a omezením onemocnění srdce a cév potvrdilo i několik epidemiologických studií (Hertog et al., 1993a, Hertog et al., 1995).

Flavonoly tvoří pouze jednu skupinu rostlinných fenolů, ale jejich antioxidační schopnosti jsou vzhledem k jejich chemické stavbě lepší než u ostatních skupin přírodních fenolů. Tyto látky jsou běžnou součástí každodenního lidského jídelníčku, vyskytují se v ovoci, zelenině a ostatních potravinách rostlinného původu. Průměrný příjem všech flavonoidních látek potravou se odhaduje asi na 1 g za den, z toho flavonolů asi 23 mg za den (Hollman a Katan, 1998).

Přesné údaje o obsahu jednotlivých flavonoidních látek jsou cennou informací, vzhledem k významným biologickým funkcím, které flavonoidy zastávají.

3. Teoretická část

3.1. Biosyntéza a výskyt flavonoidních látek

Rostliny syntetizují velké množství sloučenin, které bývají děleny podle funkce na primární a sekundární metabolity. Primární metabolity, které souvisí bezprostředně se základními funkcemi organismu, jsou hlavně nukleové kyseliny, bílkoviny, lipidy a sacharidy. Sekundární metabolity nemají bezprostřední důležitost pro okamžité udržení života organismu, byly dříve považovány za způsob depozice nepotřebných či zásobních látek a jejich funkce byla neznámá. Ukazuje se však, že funkce těchto látek jsou mnohem důležitější, než se zdálo. Svými účinky zajišťují udržení biologického druhu (Žďárek, 2002).

Sekundární metabolity mají funkce informační, ochranné a ekochemické, fungují jako regulátory růstu a modulátory exprese genů. Hrají klíčové role v odpovědi rostlin na stresové podmínky (změny intenzity světla, teplotní změny, ohrožení herbivory a mikrobiálními patogeny, vzájemná kompetice více rostlin). Některé sekundární metabolity fungující jako pigmenty – hmyzí atraktanty významně ovlivňují rozmnožování rostlin. Důležitá je nově objevovaná role sekundárních metabolitů v procesu předávání informací. V neposlední řadě mohou některé specifické sekundární metabolity sloužit k vysledování vzájemné příbuznosti rostlin (chemotaxonomie), protože specifita syntézy určitých látek může dosáhnout takové výše, že může přispět k rozlišení rostlinných druhů na základě chemotaxonomickém tam, kde klasifikace podle morfologických znaků již nedostačuje (Svatoš, 2002).

Mezi sekundární metabolity patří terpenické látky, alkaloidy, fenolické látky a polyaminy. Flavonoidy jsou pouze částí z velké skupiny označované jako fenolické látky. Celou skupinu rostlinných fenolů je možné rozdělit na tyto důležité podskupiny:

hydroxybenzoová a hydroxyskořicová kyseliny a jejich deriváty

hydroxykumariny

katechiny (flavanoly)

leukoanthokyanidiny a leukoanthokyaniny

anthokyanidiny a anthokyany

flavony a flavonoly

flavanony a flavanonoly

isoflavony

chalkony a aurony

ligniny a třísloviny

Poslední uvedená skupina označuje komplexní skupinu látek ne zcela jasného složení, ale se zřejmou příbuzností s ostatními rostlinnými fenoly. Flavonoidní látky jsou vývojově velmi stará skupina látek. První cévnaté rostliny je začaly syntetizovat jako filtr proti intenzivnímu UV záření (Atwell et al., 1999).

Fenolické látky tvoří početně velice rozsáhlou a strukturně pestrou skupinu přírodních látek. V rostlinné říši jsou všudypřítomné, protože jenom rostliny a mikroorganismy mají schopnost syntetizovat aromatické jádro. Biosyntéza fenolických látek vychází ve většině případů z aromatických aminokyselin. Ve srovnání s tím je u vyšších rostlin známo jen málo příkladů výstavby aromatického jádra pouze z acátových jednotek. Tato, tak zvaná polyketidová biosyntetická cesta je významnější u hub a prokaryontů a u vyšších rostlin je zastoupena zřídka, i když není vyloučena (Kindl a Wöber, 1981).

Metabolismus aromatických sloučenin patří do sekundárního metabolismu. Reakční pochody sekundárního metabolismu probíhají ve vysoce specifické vazbě na rostlinné rody a druhy. Výchozí látkou pro syntézu fenolických látek je kyselina skořicová, která poskytuje tzv. fenylypropanovou strukturu ($C_6 - C_3$). Vzniká z aromatické aminokyseliny fenylyalaninu odštěpením amoniaku. Enzym fenylyalanin-amoniak-lyasa, který katalyzuje tento metabolický krok, podléhá regulaci na mnoha úrovních (teplota, světlo, přítomnost ethylénu, koncentrace cukrů, alosterická regulace). Metabolická dráha je tedy regulována na rozhodujícím místě. (Kindl a Wöber, 1981). Vznikající kyselina skořicová může být modifikována, jak se často děje například při tvorbě ligninu. Obdobně deaminací aminokyseliny tyrosinu vzniká kyselina p-kumarová. Vedle flavonoidů může vznikat ze základní fenylypropanové struktury kyseliny skořicové mnoho dalších sloučenin. Vedle již zmíněného ligninu, který je

polymerem struktury $C_6 - C_3$, jsou produkty syntetických cest např. dimerní lignany, kumariny, chinony a alkaloidy.

Pro biosyntézu zmíněných sloučenin je většinou k dispozici více metabolických drah. Která reakční cesta bude použita, záleží jednak na rostlinném druhu, jednak na momentální metabolické situaci (například dostatek prekursorů). Jednotlivé metabolické dráhy tvoří tedy metabolickou síť (Kindl a Wöber, 1981).

V dalších krocích je kyselina skořicová kondenzována s třemi malonylovými jednotkami. Z původní struktury $C_6 - C_3$ se tak stává struktura difenylpropanová ($C_6 - C_3 - C_6$), jak bývají schematicky flavonoidní látky někdy označovány. Syntéza začíná chalkonem, který nemá heterocyklický kruh uzavřen. Celý skelet může být modifikován oxidačními a hydroxylačními reakcemi a tím vznikají všechny typy flavonoidních látek.

Popsanými metabolickými cestami vznikající flavonoidní látky se obvykle vážou na molekulu sacharidu a vytvářejí tak sloučeniny obecně označované jako glykosidy. Necukerná součást je pak nazývána aglykonem. Některé skupiny, např. katechiny, glykosidy nevytvářejí nebo se vyskytují jako estery s kyselinou gallovou. Mimo flavonoidy se ve formě glykosidů vyskytuje mnoho dalších přírodních látek. Molekula navázaného sacharidu zajišťuje lepší rozpustnost ve vodě, nezanedbatelná je i stabilizace molekuly aglykonu vlivem rezonance (Kindl a Wöber, 1981). Ke vzrůstu koncentrace aglykonů v materiálu může dojít při enzymové hydrolýze glykosidů nebo při technologickém zpracování za nevhodných podmínek (Davídek et al., 1983).

3.2. **Vlastnosti**

Podle posledních údajů je počet dosud známých flavonoidů odhadován na více než 6000 a stále jsou objevovány další. Flavonoidy jsou běžně zastoupeny ve velmi širokém spektru u krytosemenných rostlin, nahosemenné obsahují charakteristické dimerní flavony. U mechů a kaprad'orostů byly nalezeny jednoduché formy flavonoidů. Řasy a houby flavonoidy neobsahují. Živočichové včetně člověka nevytvářejí flavonoidní skelet vůbec, protože jim chybí schopnost syntézy aromatických aminokyselin.

V rostlinné říši jsou flavonoidní pigmenty všudypřítomné. Podílejí se vedle ostatních rostlinných pigmentů (karotenoidy, betalainy, chlorofyly) na vytváření

zbarvení rostlin. Mají obvykle žlutou barvu, jak již napovídá jejich název vytvořený od latinského slova flavus, tj. žlutý. Jsou nositeli barvy květů a pylu, plodů, kůry a dřeva. Některé mají svíravou a hořkou chuť (Velíšek, 1999). Vzhledem ke své aromatické povaze vykazují absorpci v UV oblasti s absorpčními maximy kolem vlnových délek 210 a 270 nm. Další absorpční maximum leží již ve viditelné oblasti kolem vlnové délky 380 nm.

Anthokyaniny patří také do skupiny flavonoidů, mají barvu podle hodnoty pH červenou až modrou a dávají barvu mnohým květům a plodům. Anthokyanová barviva jsou ve vodě rozpustná a je známo asi 300 zástupců. Jsou lokalizována v buněčných vakuolách a stabilizována interakcemi s organickými kyselinami. Charakter jejich barvy závisí na pH prostředí. V kyselém prostředí jsou červené, v neutrálním až alkalickém modré. Během technologického zpracování ovoce a zeleniny dochází obvykle k částečné až hlubší změně původního zbarvení (například konzervované třešně a jahody), někdy vznikají naopak intenzivněji zbarvené dimery, například při skladování červeného vína. (Velíšek, 1999).

Metabolismus flavonoidů u zvířat a člověka se intenzivně zkoumá, ale není ještě ani zdaleka odhalen. Po požití flavonoidních glykosidů dochází během procesu trávení pravděpodobně k hydrolýze glykosidových vazeb a účinkem střevní mikroflóry též ke štěpení heterocyklického cyklu flavonoidů. Aglykon je asi z 50% vyloučen stolicí. Dále vzniká větší množství štěpných produktů (zejména deriváty kyseliny benzoové a skořicové), které jsou nejčastěji jako glukuronidy vylučovány močí nebo stolicí. Pokusy byly konány nejčastěji na laboratorních zvířatech (myši, krysy) nebo se zdravými dobrovolníky, testovanými flavonoidy byly kvercetin nebo rutin jako zástupci flavonoidů nejčastěji se vyskytující v přírodním materiálu (Cook a Samman, 1996). Podle jiných výzkumů jsou flavonoidní glykosidy odolné vůči procesu trávení a přecházejí nezměněné do krve prostřednictvím glukózového transportního mechanismu (Gee et al., 1998). Velmi zajímavé jsou také farmakokinetické výzkumy, dokazující několikanásobně vyšší koncentraci rutinu vstřebeného z přírodního materiálu (pohankový čaj) než z farmaceutického preparátu (Schilcher a Hagels, 1996). Podle výsledků některých studií byla u některých flavonoidů zjištěna také mutagenní aktivita. Tato vlastnost byla sporadicky dokazována na testech s mikroorganismy (Amesův test) a některými zvířaty (da Silva et al., 2002). Výsledky nebyly jednoznačné a vzhledem k experimentálním podmínkám nepřenositelné na člověka (Formica a Regelson, 1995).

Flavonoidy mají charakter antioxidantů, protože jsou schopné likvidovat volné organické radikály vzniklé např. při oxidaci mastných kyselin a s radikály kyslíku. Vznikající fenolické radikály jsou poměrně stabilní díky rezonanci a nevyvolávají další vznik radikálů (Velíšek et al., 1999). Mohutnost antioxidantních schopností závisí na struktuře molekuly – poloze a počtu hydroxylových skupin, přítomnosti a druhu cukerné složky glykosidu (Cook a Samman, 1996). Ze všech flavonoidních látek jsou za nejúčinnější antioxidanty označovány flavonoly, které jsou též velmi rozšířenou skupinou flavonoidů v rostlinném materiálu vůbec (Suschetet et al., 1998). Díky vzájemnému uspořádání hydroxylových skupin v pozicích 1,2-mohou flavonoidy vázat prooxidační kovové ionty, zejména železa a mědi do nereaktivních chelátů. Zabraňují tak vzniku hydroxylových radikálů v systému reakcí železa a vitamínu C (Fentonova reakce - Hässig et al., 1999). Společně s vitamínem C, vitamínem E, kyselinou lípovou, karoteny, glutathionem a dalšími látkami vytvářejí antioxidantní kapacitu systému. Flavonoidy představují důležitý ochranný faktor pro vitamín C. Jednak redukují kyselinu dehydroaskorbovou zpět na askorbovou, jednak vazbou do chelátů inaktivují prooxidačně působící kovy.

Funkce flavonoidů jako účinných antioxidantů se projevuje při ochraně krevních lipidů, zejména frakce LDL, před oxidací. V organismu během metabolismu zcela přirozenou cestou vzniká určité množství radikálů. Za patologických podmínek (kouření, znečištěné prostředí, nevhodná skladba potravy) se množství volných radikálů zvětšuje. Pokud antioxidantní kapacita organismu nedostačuje a krevní lipidy jsou oxidovány, vznikají z těchto oxidací pozměněných částic aterosklerózní plaky, které se usazují na vnitřním povrchu cév. Tím roste riziko vzniku onemocnění srdce a cév, které může vyústit v infarkt nebo mozkovou mrtvici (Pánek et al., 2002). Pokud potrava obsahuje dostatečné množství přirozených antioxidantů z ovoce a zeleniny, je úroveň oxidace krevních lipidů výrazně snížena. Výrazný pokles onemocnění srdce a cév navzdory vysokému příjmu živočišných tuků byl pozorován hlavně ve Francii a státech ležících kolem Středozemního moře, což vedlo k označení této výživové anomálie jako „Francouzský paradox“ (Frankel et al., 1993, Trichopoulou et al., 1999, Ruidavets et al., 2000).

U mnohých flavonoidních látek byla zjištěna schopnost ovlivňovat aktivitu mnohých enzymů. Flavonoidy mohou přímo ovlivňovat expresi příslušného genu, častěji přímo zvyšují nebo snižují aktivitu příslušného enzymu. Pro výzkum rakoviny je

zajímavé ovlivnění aktivity enzymů, figurujících v jednotlivých fázích dělení a růstu buňky. Vedle těchto nejdůležitějších vlastností flavonoidů je možno zmínit ještě účinky protialergické, protivirové a imunomodulační. Přírodní flavonoidy také snižují nadměrný tonus cév a tím působí na snižování krevního tlaku, zejména při stresových stavech (Middleton a Kandaswami, 1993).

Je nutno si uvědomit, že každý materiál obsahuje vedle fenolických látek ještě velké množství dalších sloučenin. Dá se tedy předpokládat, že jednotlivé složky tak pestrého komplexu se budou ve svých účincích ovlivňovat. Výsledný účinek je výslednicí synergických vlivů. Celkový efekt se projevuje například v celkové antioxidační kapacitě materiálu.

3.3. Význam flavonoidů

Flavonoidy a ostatní fenolické látky jsou přirozenou součástí všech vyšších rostlin. Mají různé funkce, jak pro vlastní produkční rostlinu, tak pro býložravá zvířata a v neposlední řadě i pro člověka, který konzumuje ovoce, zeleninu a další potraviny rostlinného původu. Flavonoidy fungují jako látky ochranné, jsou účinné antioxidanty, mají schopnost chelatace iontů, regulují aktivitu mnohých enzymů. Jako barevné látky slouží jako hmyzí atraktanty při opylování a v neposlední řadě je rostliny používají k přenosu informací.

Z hlediska vývojového jsou flavonoidy skupinou látek, které se vyvinuly jako ochrana proti UV záření v dobách, kdy se ozónová vrstva teprve vytvářela. Pro tuto teorii mluví výsledky pokusů prováděných na Novém Zélandu. Pokusné rostliny vystavené zvýšené intenzitě dopadajícího UV záření vytvářely větší množství flavonoidů (Atwell et al., 1999). I současné vyšší rostliny užívají flavonoidní barviva jako filtr, který zabraňuje poškození zejména mladých pletiv velkou intenzitou slunečního záření.

Rostliny se nemohou bránit proti vnějšímu útoku patogenů či herbivorů aktivním pohybem (útok, útek), volí tedy ochranu chemickou. Právě mnohé látky z velkého množství sekundárních metabolitů, a mezi nimi zejména flavonoidy slouží rostlinám pro ochranu proti vnějšímu napadení.

Některé sekundární metabolity mohou sloužit produkční rostlině k inhibici růstu rostliny jiné. Tato situace je označována jako alelopathie (Procházka et al., 1998, Berhow a Vaughn, 1999). K vzájemnému ovlivňování dochází zejména prostřednictvím fenolických látek. Například flavonoidy jsou vylučovány kořeny nebo se uvolňují z odumřelých pletiv a inhibují buď klíčení semen nebo růst kořenů konkurenční rostliny. Velmi často je tato situace pozorována u běžných plevelů, které omezují klíčení a růst mnohých kulturních rostlin, např. sóji, ředkviček, hořčice, cibule, chřestu (Berhow a Vaughn, 1999).

Rostliny, s nimiž žijí v symbióze bakterie fixující dusík, používají některé flavonoidní látky vylučované kořeny jako chemický atraktant pro zmíněné bakterie. Tento signál slouží bakterii k rozpoznání vhodné hostitelské rostliny (Procházka et al., 1998).

Častými rostlinnými patogeny jsou mikroorganismy a houby. Také zde rostliny používají flavonoidní látky k obraně proti invazi cizího organismu. Ochranný účinek zde mají flavonoidy, které rostlina syntetizuje během celého života. Výhodnější je však syntetizovat ochrannou látku až při napadení, protože syntéza je většinou pro rostlinu náročná. Podnětem pro spuštění obranné reakce bývá specifický metabolit uvolňovaný při počátku interakce buňky s patogenem, takzvaný elicitor. Může to být fragment buněčné stěny nebo látka vylučovaná patogenem (Procházka et al., 1998). Elicitor působí na aktivaci vhodných genů a tím způsobí syntézu specifické obranné látky. Ta bývá nazývána fytoalexin a vedle flavonolů to mohou být dále terpeny, kumariny nebo stilbeny. Tyto ochranné látky jsou velmi toxické pro patogen již ve velmi nízkých koncentracích. Flavonoidní fytoalexiny byly zaznamenány u vojtěšky, sóji, brambor, fazolí, jabloní a dalších kulturních plodin (Berhow a Vaughn, 1999).

Živočichové, kteří se živí rostlinami, získávají mimo potřebné sloučeniny ještě nezanedbatelné množství rostlinných sekundárních metabolitů. Konzumace mnohých z nich se nijak neprojevuje, některé však mají na metabolismus konzumenta výrazný vliv. Některé sekundární metabolity jsou cíleně syntetizovány k omezení požeru býložravcem. Sem patří některé flavonoidy, mezi nimi zejména izoflavony, flavony a flavonoly, které slouží rostlinám jako přirozený ochranný prostředek proti býložravému hmyzu. Tyto látky fungují buď jako metabolické jedy nebo odrazují hmyz nepříjemnou

chutí a často slouží rostlině také jako chemická ochrana před mikrobiálními patogeny přenášenými hmyzem.

Také ostatní živočichové, kteří se živí rostlinami, se setkávají s účinky sekundárních rostlinných metabolitů. Flavonoidy a ostatní fenolické látky mívají svíravou nebo hořkou chuť, čímž ovlivňují množství rostliny zkonsumované zvířetem. Lignin, který patří mezi látky zpevňující rostlinná pletiva, způsobuje tuhost rostlin a tím menší přitažlivost pro býložravce. Isoflavony, skupina látek náležejících mezi flavonoidy, mají estrogenní účinky. Narušují normální účinky vlastních estrogenů a patří mezi přirozené toxické látky zejména pro domácí zvířata (Kalač a Míka, 1997).

Flavonoidní látky vykazují u člověka řadu zajímavých fyziologických účinků. Už od počátku jejich výzkumu byla zaznamenána jejich schopnost snižovat fragilitu cévní stěny (Holmann et al., 1996) a zejména rutin a jeho deriváty jsou již dlouho používány pro léčbu defektů cév a krvácivých stavů. Velmi významná je antioxidační schopnost flavonoidních látek. Přítomnost volných radikálů je pro každý živý organismus riziková. Volné radikály jsou velmi reaktivní a mohou způsobit poškození nejrůznějších biologických makromolekul a buněčných struktur. Poškození DNA může vést ke vzniku nádorů. Do tohoto procesu zasahují flavonoidy jak svou aktivitou antioxidační, tak schopností ovlivňovat aktivitu mnohých enzymů a to i těch, které vystupují v procesu karcinogeneze (Suschetet et al., 1996).

Příznivé schopnosti přírodních flavonoidů na omezení aterosklerózy byly potvrzeny výsledky několika epidemiologických studií. Průkaznou reciproční závislost mezi příjmem flavonoidů a výskytem onemocnění srdce a cév zjistili autoři rozsáhlého sledování 805 mužů ve výzkumu s názvem „The Zutphen Elderly Study“ (Hertog et al., 1993a). Srovnání způsobu stravování v různých zemích a příjmu flavonoidů a jeho vliv na úmrtnost na onemocnění srdce a cév provedli autoři v tzv. „cross-cultural“ studii „The Seven Countries Study“ (Hertog et al., 1995). Opět byl potvrzen příznivý vliv vyššího příjmu flavonoidů na lidské zdraví. Kohortní studie „The Caerphilly Study“ sledovala skupinu mužů středního věku a hodnotila incidenci ischemické choroby srdeční (Hertog et al., 1997). Došla mimo jiné k zajímavému závěru, že vstřebávání flavonoidů z čaje zřejmě brání přidavek mléka.

3.4. Výživové zdroje flavonoidů

Podle dlouhodobých výsledků výzkumu mají flavonoidy pro člověka velmi významné vlastnosti. Zejména funkce při prevenci a léčbě onemocnění srdce a cév a rakoviny, což jsou onemocnění takzvaně „civilizační“, činí tuto skupinu látek z výživového hlediska velmi cennou. Pro své vlastnosti jsou flavonoidní látky v poslední době zařazovány mezi tzv. nutraceutika a potraviny je obsahující jsou označovány jako funkční potraviny (Hasler, 2000).

Jak už bylo uvedeno, jsou flavonoidy látky výhradně rostlinného původu. Vyskytují se tedy nejen v čerstvém ovoci a zelenině, ale také v obilovinách a potravinách vyráběných z rostlinných surovin. Jejich obsah je však nejvyšší v čerstvém materiálu, zpracováním a skladováním obvykle klesá. Různé je též rozložení celkového obsahu v částech rostlin. Nejvyšší koncentrace flavonoidních látek se nacházejí v povrchových částech plodů (slupky), směrem do středu plodu koncentrace klesá (Davídek et al., 1983). V rostlinné buňce jsou soustředěny ve vakuolách.

Flavonoidy jsou přítomny v materiálu prakticky vždy jako glykosidy. Obsah aglykonů může někdy vzrůst při technologickém zpracování (Davídek et al., 1983). Vzhledem k tomu, že flavonoidní glykosidy jsou poměrně dobře rozpustné ve vodě, hrozí při zpracování ztráty vyluhováním. V enzymově aktivních materiálech (čerstvé ovoce, zelenina) a při mechanickém poškození pletiv některé flavonoidy a ostatní fenolické látky vstupují do reakcí enzymového a neenzymového hnědnutí (Velíšek, 1999). Produkty těchto reakcí jsou barevné pigmenty, které nežádoucím způsobem zbarvují zpracovávaný rostlinný materiál a potraviny. Někdy je tvorba barevných pigmentů žádaná (fermentace čaje), i v těchto případech se v jejich tvorbě angažují některé skupiny flavonoidů. Jindy není vytvářené zbarvení materiálu žádoucí (hnědnutí jablek, brambor) a je snahou ho technologicky potlačit. Anthokyany, které také patří mezi flavonoidy, podléhají podle pH prostředí různým reakcím, které vedou ke změnám zbarvení materiálu nebo až k odbarvení (Velíšek, 1999).

Flavonoidy se v materiálech obvykle vyskytují v pestrých směsích, zřídka převažuje jedna či několik málo sloučenin. Jako aglykony flavonoidních glykosidů se vyskytuje pouze poměrně málo látek. Nejrozšířenějším je flavonol kvercetin, mezi další patří flavonoly kemferol a myricetin a dále flavony apigenin a luteolin. Nejběžnějším glykosidem je rutin (kvercetin-3-O-D- rutinosid). Koncentrace jednotlivých látek

bývají nízké (obvykle desítky, výjimečně stovky mg v kg sušiny), pouze ve ojedinělých případech dosahují hodnot jednotek procent (počítáno na sušinu).

3.5. Ovoce a zelenina

Jedlé plody a části nejrůznějších rostlin jsou všeobecně oblíbenou a hojně konzumovanou skupinou rostlinných potravin. Požívají se v čerstvém stavu, konzervované či různě kuchyňsky upravované. Mimo obvyklé a známé látky, jako například sacharidy, vlákninu a vitamín C, obsahují různé množství flavonoidních látek. Barva materiálu je obvykle tvořena několika pigmenty (anthokyany a ostatní flavonoidy, karotenoidy, betalainy, chlorofyl). Výsledná barva bývá ovlivňována všemi barevnými složkami (Velíšek, 1999, Forkmann, 1991).

Z flavonoidů se v ovoci a zelenině nejvíce vyskytují flavonoly a flavony. Jsou to nejrozšířenější žluté rostlinné pigmenty. Flavonol kvercetin je naprosto dominantním aglykonem, následují flavonoly kemferol a myricetin a flavony apigenin a luteolin. V citrusovém ovoci se nacházejí flavanony naringin, hesperidin a neohesperidin, které mají hořkou chuť. Zelenina vykazuje oproti ovoci poněkud větší obsahu kemferolu (Hertog et al., 1992b). Ostatní zástupci jsou však málo významné pro svůj nízký obsah či sporadický výskyt.

Z dalších flavonoidů jsou nejvýznamnější zejména anthokyany. Ve významných množstvích se vyskytují v barevném ovoci z několika čeledí. V první řadě je to čeleď růžovitých, kam patří mnoho nejběžnějších druhů ovoce, např. třešně, jablka, švestky, maliny, ostružiny a jiné. Čeleď révovité poskytuje oblíbené ovoce i surovinu pro výrobu révového vína – hrozny révy vinné. Drobné bobulové ovoce, jako borůvky, brusinky, klikva patří do čeledi vřesovcovitých. Také některé další čeledi mají zástupce mezi rostlinami bohatými na anthokyany (lomikamenovité, aj.). Zbarvení ovoce je poměrně málo stabilní. Hlavními faktory ovlivňujícími jejich barvu a stabilitu jsou struktura molekuly, přítomnost některých enzymů, pH prostředí, teplota, přítomnost kyslíku a působení záření (Velíšek, 1999). Z anthokyanů mohou vznikat také jinak barevné či bezbarvé produkty reakcemi s jinými složkami potravin, např. kyselinou askorbovou, oxidem siřičitým, jinými fenoly, kovovými ionty aj.

Katechiny jsou flavonoidní látky obecně se vyskytující ve všech rostlinných materiálech. Spolu s estery kyseliny gallové jsou někdy označovány jako třísloviny.

Jsou nositeli trpké a svíravé chuti, která se projevuje zejména v nezralém ovoci. Jejich koncentrace zráním klesá (Davídek et al., 1983). Flavonoidní látky jsou přirozenou součástí ovoce a zeleniny a potravin z nich vyráběných a vyskytují se v nich někdy v poměrně vysokých množstvích. Pro lidskou výživu jsou ovoce a zelenina významným zdrojem těchto cenných látek.

3.6. Nápoje

Nápoje vyráběné z rostlinného materiálu mají přirozený obsah flavonoidních látek, daný jejich obsahem v surovině. Tento obsah je obvykle nižší v porovnání s původní surovinou, přesto může představovat významný zdroj flavonoidních sloučenin ve výživě. Při technologickém zpracování podléhají fenolické látky mnoha reakcím (enzymové a neenzymové hnědnutí), které mají za následek změnu složení.

Velmi bohatým zdrojem přírodních fenolických látek je čaj (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz), a to jak zelený, tak fermentovaný černý. Čerstvé listy čaje obsahují až 20% katechinů ve formě esterů s kyselinou gallovou, počítáno na sušinu (Davídek et al., 1983). Při fermentaci užívané při výrobě černého čaje klesá obsah katechinů na 3 % a vznikají oligomerní barevné pigmenty (teaflaviny a tearubiginy) typické pro barvu a chuť černého čaje. Obsah flavonolů, zejména kvercetinu, zůstává přibližně stálý (Tijburg et al., 1997). Také kakaové boby a zelená káva obsahují katechiny, které během procesu zpracování přecházejí na barevné oligomery (Davídek et al., 1983).

Flavonoidy nalezené v pivu pocházejí jak z chmele, tak ze sladu. Jsou to technologicky významné katechiny a leukoanthokyanidiny a fenolové kyseliny (Whittle et al., 1999). Hotové pivo obsahuje též určité množství kvercetinu, řádově jednotky mg na litr výrobku (Hertog et al., 1993b).

Bohatým zdrojem anthokyanů a dalších flavonoidů jsou plody révy vinné (*Vitis vinifera* L.). Plody vinné révy obsahují flavonoidní látky zejména ve slupce. Obsah flavonoidů se tedy výrazným způsobem liší u červeného a bílého révového vína. Také složení barevných anthokyanů se mění. Během zrání červených vín dochází ke tvorbě stabilnějších dimerních pigmentů. Víno, zejména červené, obsahuje také stilben resveratrol. Je to látka příbuzná flavonoidům a podle posledních výzkumů vykazuje zajímavé kardioprotektivní účinky (Frankel et al., 1993, Stecher et al., 2001). Révová vína obsahují také katechiny, fenolové kyseliny a flavonoly kvercetin a myricetin

(Ritchey a Waterhouse, 1999). Umírněná konzumace zejména červeného vína bývá dávána do souvislosti se snižováním úmrtnosti na onemocnění srdce a cév (tzv. Francouzský paradox). Také flavonoidy přítomné v čaji mají intenzivní antioxidační účinky. V zemích, ve kterých se konzumuje velké množství čaje, je zaznamenána nižší úmrtnost na onemocnění srdce a cév (Tijburn et al., 1997). Pivo obsahuje příliš malé množství flavonoidů na to, aby jejich účinky převážily nepříznivý vliv přijatého alkoholu (Hertog et al., 1993b). Bylo nicméně zjištěno a potvrzeno epidemiologickými studiemi (Barefoot et al., 2002), že umírněná konzumace alkoholických nápojů, zejména révového vína je spojená s lepším zdravím.

Jak je vidět, jsou nápoje významnými zdroji flavonoidů ve výživě. Doporučení konzumace červeného vína by ale nemělo vyznít jako nabádání k alkoholismu.

3.7. Pohanka

V posledních letech získává pohanka významné postavení jako alternativní zemědělská plodina a je zaznamenán výrazný zájem o její pěstování a konzumaci. Z agronomického hlediska je cenná její obecná nenáročnost na pěstitelské podmínky, krátká vegetační doba a odolnost proti biotickým stresům. Má vysokou výživovou hodnotu, pro nepřítomnost lepku se hodí pro výživu nemocných celiakií a zejména je známá jako jedinečný zdroj přírodního rutinu (Lachman et al., 2000, Holasova et al., 2002). Právem je v současnosti zařazována mezi funkční potraviny. Její bílkovina má velmi příznivé aminokyselinové složení a spolu s vysokým obsahem rutinu a katechinů v materiálu působí na snižování hladiny cholesterolu v krvi (Li a Zhang, 2001).

Pohanka setá (*Fagopyrum esculentum Moench.*) pochází z Asie a pěstuje se v několika odrůdách (Li a Zhang, 2001). Je nejstarší rostlinou obsahující rutin, která byla systematicky zkoumána (Couch et al., 1946).

3.8. Ostatní zdroje flavonoidů

V luštěninách a ostatních zástupcích z čeledi bobovitých se vyskytují isoflavony s hlavními zástupci genistinem, daidzinem a glycitinem. Tyto flavonoidní látky přítomné zejména v semenech sóji luštinaté (*Glycinus max L.*) dávají těmto potravinám nahořklou a svíravou chuť (Aussenac et al., 1998). Bylo zjištěno, že isoflavony vykazují

estrogenní aktivitu, což se může nepříznivě projevit u hospodářských zvířat (Kalač a Míka, 1997). Podle některých studií konzumace velkého množství výrobků ze sóji zřejmě přispívá k omezení některých druhů rakoviny (MacDonald, 2005).

Určitý obsah flavonoidů byl nalezen také v medu a propolisu (Hilhorst et al., 1998). Spektrum přítomných flavonoidů kopíruje flavonoidy přítomné v rostlinách, ze kterých pocházel nektar a pyl zpracovávaný včelami. Obsah přítomných flavonoidů je však příliš nízký na to, aby byl med významným zdrojem flavonoidních látek. Informace o výskytu jednotlivých flavonoidů se dají použít k určení původu medu (Ferrerres et al., 1994).

Farmakologicky aktivní flavonoidy byly nalezeny v mnoha léčivých rostlinách a tradičních léčivých přípravcích rostlinného původu. Často zkoumané v tomto směru jsou přípravky tradiční čínské bylinné medicíny (Pietta et al., 1991, Liang et al., 1996, Liang et al., 1997). Obsahují mnoho často strukturně netypických flavonoidních látek a bývají jim přisuzovány mimořádné účinky. Též mezi evropskými léčivkami je řada, ve kterých byly objeveny flavonoidy. Domácí léčivkou se zaznamenaným obsahem flavonoidních látek je u nás běžná třezalka tečkovaná (*Hypericum perforatum* L.), známá zatím spíše svým obsahem fotoaktivního pigmentu hypericinu (Brolis et al., 1998). Třezalka je tradičně užívaná jako léčivka se sedativními účinky. Je velmi pravděpodobné, že i ostatní léčivé rostliny mají významný obsah flavonoidních látek. Na obsah flavonoidních látek bylo již upozorněno (Korbelář a Endris, 1985), prostor pro další výzkum zůstává zcela otevřen.

Mnoho z rostlin používaných jako zelená koření vedle typických vonných a chuťových látek obsahují také flavonoidní sloučeniny. V běžných bylinkách (bazalka, koriandr, máta, rozmarýna, petržel, dobromysl a další) byly nalezeny zejména kvercetin, kemferol, apigenin a luteolin (Justesen a Knuthsen, 2001). Vzhledem k poměrně malým množstvím, ve kterých se zelené koření používá, se asi nestane významným zdrojem flavonoidů v potravě.

3.9. **Analýza flavonoidů**

Přírodní flavonoidy představují velmi bohatou skupinu několika tisíc sloučenin, která je členěna do sedmi hlavních podskupin podle stupně nenasycenosti a oxidovanosti (Cook a Samman, 1996). Analyzované materiály obvykle obsahují více

zástupců často z několika skupin flavonoidů. Vzhledem k fyzikálním a chemickým odlišnostem jednotlivých skupin flavonoidů není dost dobře možné obsáhnout jedním analytickým postupem všechny zastoupené látky.

V rostlinných materiálech zajímavých pro výživu člověka, tj. ovoci, zelenině, obilovinách, léčivých rostlinách a dalších zemědělských plodinách jsou nejvíce zastoupenou skupinou flavonoidů flavonoly, méně již flavony. Tyto fenolické látky se v rostlinném materiálu vyskytují hlavně ve formě glykosidů, navázané na některý cukr. Glykosidů bývá v přírodním materiálu obvykle zastoupeno více druhů, kdežto aglykonů se běžně vyskytuje jen několik. Z flavonolů je to zejména kvercetin, kemferol a myricetin, flavony reprezentují zejména apigenin a luteolin. Volné aglykony se vyskytují minimálně, z glykosidické vazby se uvolňují při některých technologických postupech (Davídek et al., 1983) a ve fermentovaných potravinách (Dadáková et al., 2003). Jejich obsah bývá ve srovnání s příslušnými glykosidy nízký.

Analytika flavonoidních sloučenin se dělí na oblast kvalitativní, která se zajímá o zjištění zastoupení všech flavonoidních látek v daném materiálu a oblast kvantitativní, kdy je zjišťován obsah buď jednotlivých flavonoidů nebo celkové množství vybraných látek v testovaném materiálu. Také může být stanovován celkový obsah jednotlivých flavonoidních aglykonů. Toto stanovení vyžaduje hydrolýzu všech přítomných glykosidických forem jednotlivých aglykonů. Vzhledem k tomu, že flavonoidy mají charakter fenolických látek, jsou zahrnovány do stanovení tzv. celkových fenolů. V poslední době se také objevuje snaha postihnout celkové antioxidační schopnosti materiálu (nejčastěji potravin) jednotným hodnotícím kritériem. Pro tyto účely bylo vyvinuto stanovení tzv. antioxidační aktivity. Protože flavonoidní látky mají výrazné antioxidační schopnosti, podílejí se významným způsobem na zjištěné hodnotě antioxidační aktivity.

Se zájmem o flavonoidy jako biologicky aktivní látky se začala v polovině 20. století rozvíjet jejich analytika. Vzhledem ke komplexnosti testovaných vzorků bylo nutno zvolit vhodnou dělicí metodu. První kvalitativní a semikvantitativní metody užívaly pro dělení sloupcovou chromatografií, pro detekci zejména chromatografií na papíře a v uspořádání na tenké vrstvě (Davídek et al., 1983). S rozvojem výzkumu přírodních látek se stále více používaly kapalinová chromatografie a o něco později také kapilární elektroforéza. Jsou to v podstatě nejpoužívanější metody pro detekci a

stanovení flavonoidních látek. Ostatní metody (metody elektrochemické a imunologické) se používají spíše ve speciálních případech.

Všechny analytické metody mají totožné části: vzorkování a úprava vzorku, extrakce nebo hydrolýza materiálu, zakoncentrování analytu a analytickou koncovku s vyhodnocením výsledků.

3.9.1. Vzorkování

Ať je už metoda určena k jakémukoli účelu, vždy jí musí předcházet odběr, předběžné zpracování a skladování vzorku. Vzorek tvoří většinou rostlinné materiály, ovoce, zelenina nebo potraviny rostlinného původu. Jsou to vesměs materiály rychle podléhající zkáze. Zpracování musí tedy následovat bezprostředně po sklizni u ovoce a zeleniny nebo otevření spotřebitelského obalu u potravin. Pokud je to nezbytné, ukládá se materiál při nízké teplotě, většinou v chladničce. Flavonoidy mohou být sledovány v průměrném vzorku jedlé části, čímž se získají údaje zajímavé pro běžného konzumenta. Pro speciální studie může být materiál dělen na definované části, například části rostliny – květ, stonek, listy atd. Z výsledků se tady dá vysledovat distribuce sledované látky v materiálu. Způsob vzorkování je vždy součástí metodiky.

Čerstvý rostlinný materiál má aktivní enzymové systémy a při delším skladování i při nižší teplotě by mohly proběhnout nežádoucí reakce. Ty by vedly ke změnám v zastoupení a obsahu jednotlivých sledovaných látek. Proto se materiál obvykle pro delší skladování před analýzou zbavuje vody. Nejrozšířenějším a nejšetnějším způsobem je lyofilizace. Lyofilizovaný materiál má také vhodnou konzistenci pro homogenizaci. Její zařazení do postupu je naprosto nezbytné, protože zastoupení flavonoidů např. v jednom ovocném plodu může být nerovnoměrné. Homogenizace bývá prováděna v třecí misce, tužší vzorky se musí mlít ve speciálních mlýncích. Rozdrcený materiál je skladován ve vzduchotěsných vzorkovnicích obvykle při teplotě -16°C . Za těchto podmínek je vzorek materiálu stálý minimálně 1 rok (Hertog et al., 1992a). Potraviny a nápoje rostlinného původu jsou skladovány v chladu a temnu, po otevření spotřebitelského balení je žádoucí provést analýzu co nejdříve.

3.9.2. Izolace látek z materiálu

Prvním krokem analytické metody je obvykle izolace sledovaných látek ze vzorku, jejich vyčištění a zakoncentrování. Materiály, ve kterých jsou fenolické látky stanovovány, představují nejčastěji komplexní biologické matrice. Cílem úpravy materiálu je získat vzorek co možná nejvíce obohacený o látky, které jsou stanovovány a s co nejnižším obsahem balastních a interferujících látek. Je žádoucí, aby postup, vedoucí k izolaci analytu, způsoboval minimální ztráty látky. Mnohé fenolické látky mohou podléhat během zpracování materiálu např. oxidačním či hydrolytickým změnám, je tedy třeba izolační postup volit tak, aby reakce neprobíhaly či aby ztráty byly definované. Další nezanedbatelné ztráty může přinést derivatizační krok, pokud je v metodice použit. Vzhledem ke komplexnosti zpracovávaných matric a náročnosti izolačních postupů je velmi vhodné mít dokonale podchyceny zdroje a velikost možných chyb, například rozbořem dílčích nejistot.

Další způsob zpracování vzorku závisí na tom, zda cílem práce je zjistit kvalitativní zastoupení jednotlivých flavonoidních sloučenin v materiálu či se má určit obsah některého flavonoidního aglykonu. Flavonoidy jsou přítomny v materiálu výhradně ve formě glykosidů. Glykosidická vazba může být rozštěpena buď enzymově či v kyselém prostředí. Po provedené hydrolýze všech glykosidických forem je možno stanovit celkový obsah flavonoidního aglykonu. Vzhledem k tomu, že obsah volně se vyskytujících aglykonů je v přirozeném materiálu velmi nízký, reprezentuje celkový obsah aglykonu veškeré glykosidické formy dané látky, přítomné v materiálu.

3.9.3. Analýza glykosidů

Velmi zřídka, pokud to charakter vzorku dovoluje, je vzorek použit přímo k analýze. Bez úpravy bývají analyzovány nejčastěji nápoje, které neobsahují tuhý podíl a lze předpokládat nízký obsah doprovodných balastních látek. Těmto požadavkům vyhovují v podstatě pouze nápoje (víno, čaj, ovocná šťáva). Vzorky mohou být k analýze používány bez ředění, pouze upraveny filtrací (Vinas et al., 2000, López et al., 2001, Shui a Loeng, 2002). V jiných postupech jsou vzorky filtrovány přes membránové filtry a ředěny používanou mobilní fází pro HPLC (Castellari et al., 2000) nebo kapilární elektroforézu (Prasongsidh a Skurray, 1998). Šťávy z citrusových plodů jsou před analýzou odstředěny, filtrovány a ředěny pracovním pufrem (Cancalon a

Bryan, 1993). Dá se ale říci, že používání vzorku bez úpravy či předběžné izolace analytu je postupem omezeně používaným, využitelným pouze pro úzký okruh vzorků a zatěžující přístroj doprovodnými látkami.

Častější způsob úpravy materiálu je předběžná extrakce, případně zkoncentrování a přečištění analyzované látky vhodným extrakčním postupem. Pro extrakci flavonoidních glykosidů je třeba z materiálu extrakcí získat sledované látky bez uvolnění aglykonů z glykosidických vazeb. Kapalně vzorky jsou extrahovány pomocí nemísitelného rozpouštědla. Při získávání flavonoidních látek ze sušeného rostlinného materiálu je homogenizovaný materiál podroben extrakci zvoleným vhodným rozpouštědlem či jejich směsí za tepla.

Extrakce bývá prováděna v Soxhletově extraktoru, ve varné baňce pod zpětným chladičem či za pomoci ultrazvuku. Extrakce nemísitelným rozpouštědlem se realizuje v menších nádobách. Zbytky vyextrahovaného rostlinného materiálu jsou odstraňovány nejčastěji filtrací či odstředěním. Hotový extrakt je buď přímo použit k analýze nebo je ještě podroben přečištění. Jako čistící a koncentrační metoda se používá SPE. Někdy je extrakční činidlo odpařeno do sucha a odparek je rozpouštěn v methanolu či vhodném pufu. Vzhledem k velkému sortimentu zpracovávaného materiálu a široké paletě studovaných látek neexistuje jednotný postup extrakce a stále se objevují další varianty.

Flavonoidní látky obsažené v červených vínech bývají extrahovány do diethyletheru (Garcia-Viguera a Bridle, 1995, Gil et al., 1995, Rodriguez-Delgado et al., 2000, Rodriguez-Delgado et al., 2002,). Etherový extrakt je vysušen nejčastěji proudem dusíku a odparek je poté rozpuštěn v methanolu. Výhodou je snadná těkavost diethyletheru při odpařování, nevýhodou pak určitá rozpustnost rozpouštědla v matrici. Některé kapalně vzorky, zejména jablečná šťáva, mohou být extrahovány ethylacetátem (Picinelli et al., 1997). Také zde je organická fáze odpařena a odparek se rozpouští v methanolu.

Velmi často voleným extrakčním činidlem jsou alkoholy (methanol, ethanol). Často se používá čistý methanol, kterým se extrahuje široké spektrum fenolických látek z rybízu černého (Fernandez et al., 1996), léčivých rostlin (Cao et al., 2002, Urbánek et al., 2002, Hawryl et al., 2002, Cheung et al., 2003). Extrakční činidlo vytvořené směsí methanolu nebo ethanolu a vody v různém poměru se objevuje v mnoha pracech. Je vhodným extrakčním činidlem pro nápoje (Kulomaa et al., 1997), léčivé rostliny

(Pastene et al., 2000, Cao et al., 2001, Cao et al., 2002.), ovoce nebo zeleninu (Hertog et al., 1992a) nebo ostatní rostlinný nebo jiný materiál (Lachman a Pivec, 1996, Lachman et al., 2000). Pro izolaci flavonoidních glykosidů z jablek je methanol míchán s vodou a kyselinou octovou a extrakt je přečištěn na sloupci polyamidu (Price et al., 1999). Přečištění na sloupci sorbentu umožní zbavit se balastních doprovodných látek, zejména polárních.

Dalšími používanými rozpouštědly jsou aceton, který slouží pro extrakci širokého spektra fenolických kyselin a flavonoidních glykosidů zejména z jablek a broskví (Schieber et al., 2001).

Speciální postupy postupné extrakce několika extrakčními činidly byly zvoleny u propolisu a medu (Hilhorst et al., 1998, Ferreres et al., 1994) nebo některých léčivěk (Kolesnikov a Gins, 2001). Pro analýzu propolisu byl navržen extrakční postup, kterým dojde k rozdělení obsahových látek na frakci rozpustnou ve vodě (zejména deriváty fenolických kyselin) a frakci rozpustnou ve zředěném ethanolu (hlavně flavonoidy). Postup navržený pro léčivky slouží k identifikaci všech fenolických látek přítomných v materiálu.

V posledních letech se objevuje použití superkritické fluidní extrakce jako velmi efektivního a šetrného způsobu izolace analytu ze zkoumaného materiálu (Kulomaa et al., 1997). Tato metoda je ale instrumentálně nákladná a nedošla v analytice flavonoidů většího rozšíření.

Zvláštní postavení mezi flavonoidními glykosidy má rutin (kvercetin-O-D-rutinosid). Bývá před analýzou extrahován do roztoku v Soxhletově extraktoru či ve varné baňce pod zpětným chladičem, zbytky rostlinného materiálu jsou odstraněny odstředěním nebo filtrací. Jako extrakční činidla slouží obvykle ethanol čistý (Watanabe, 1998, Dierych-Szostak a Oleszek, 1999) či v roztoku s vodou (Lachman et al., 2000, Chen et al., 2001), methanol (Minami et al., 1998) či směsi rozpouštědel (Kreft et al., 1999).

3.9.4. Analýza aglykonů

Spektrum flavonoidních glykosidů přítomných v rostlinném materiálu je obvykle velké a obsahy jednotlivých látek bývají zároveň nízké. To znesnadňuje

zejména kvantitativní analýzu těchto látek, protože standardy většiny glykosidů nejsou obvykle snadno dostupné. Na druhou stranu počet aglykonů, vytvářejících tyto glykosidy, je poměrně omezený, přičemž dominujících aglykonů je pouze několik. Vzhledem k tomu, že flavonoidy se v materiálu vyskytují výhradně jako glykosidy, je výhodné provést hydrolyzu přítomných glykosidů a stanovit celkový obsah vybraných aglykonů. Tato informace je dobrým ukazatelem o celkovém obsahu všech glykosidických forem sledované látky.

Hydrolyza glykosidických vazeb mezi aglykonem a sacharidickou částí molekuly může být provedena pomocí kyseliny nebo v alkalickém prostředí.

Metodika kyselé hydrolyzy byla rozpracována již v polovině 60. let 20. století (Harborne, 1965), ale metoda byla optimalizována Hertogem et al., (1992a) a stala se standardní metodou, na kterou navazují ostatní pracoviště (Crozier et al., 1997, Häkkinen et al., 1998, Justesen et al., 1998, Karakaya a El Nehir, 1999, Careri et al., 2000, Dadáková et al., 2001, Tsanova-Savova a Rybarova, 2002, Sakakibara et al., 2003). Při kyselé hydrolyze dochází ke spolehlivému uvolnění aglykonů, agresivní prostředí však způsobuje částečnou degradaci analytů (zejména kemferolu), takže je vhodné pracovat např. metodou standardních přísadků (Häkkinen et al., 1999, Dadáková et al., 2001), aby bylo možno správně vyhodnotit skutečnou koncentraci stanovované látky. Provedení kyselé hydrolyzy však nevyžaduje zvláštní vybavení, je prováděna obvykle za tepla vařením materiálu ve zředěném methanolu pod zpětným chladičem.

Při hydrolyzách bývá obvykle používán přísaděk antioxidantu k zamezení ztrát analytu během procesu. Jako antioxidační činidlo je používán t-butyhydrochinon (Hertog et al., 1992a, Karakaya a El Nehir, 1999, Häkkinen et al., 1998, Merken a Beecher, 2000), butylhydroxyanizol (Justesen et al., 1998), butylhydroxytoluen (Careri et al., 2000), diethyldithiokarbamát (Crozier et al., 1997, Tsanova-Savova a Rybarova, 2002) nebo kyselina askorbová (Häkkinen et al., 1998, Picinelli et al., 1997, Dadáková et al., 2001).

V původní práci (Hertog et al., 1992a) bylo testováno použití kyselin chlorovodíkové a sírové v různých koncentracích. Pro kompletní hydrolyzu glykosidů dostačuje dvouhodinová hydrolyza pomocí HCl o koncentraci 1,2 mol.l⁻¹. Tyto podmínky byly použity při analýze flavonoidních aglykonů v ovoci a zelenině (Hertog

et al., 1992b, Justesen et al., 1998, Sakakibara et al., 2003, Crozier et al., 1997), nápojích (Hertog et al., 1993b, Sakakibara et al., 2003, Justesen et al., 1998), v drobném bobulovém ovoci (Häkkinen et al., 1999), vínech (Tsanova-Savova a Rybarova, 2002, McDonald et al., 1998) a dalším rostlinném materiálu (Karakaya a El Nehir, 1999, Trichopoulou et al., 2000, Merken a Beecher, 2000).

Alkalická hydrolyza je používána podstatně méně než kyselá (Kader et al., 1996), zejména při analýze fenolických kyselin.

Po hydrolyze je vzorek zfiltrován, aby byly odstraněny mechanické části materiálu. Jako filtrační materiál je obvykle použit membránový filtr. Přebytek rozpouštědla, pokud ruší při stanovení, bývá odpařen na rotační vakuové odparce. Zbytky materiálu mohou být také odstředěny. Přefiltrovaný hydrolyzát je obvykle použit přímo k analýze nebo může být před analytickou koncovkou ještě čištěn a analyt zakoncentrován.

3.9.5. Analytická koncovka

Předchozí metodický krok sloužil ve všech případech k převedení analytu do roztoku a byl získán roztok, který představuje velmi komplikovanou směs nejrůznějších látek. Při kvalitativní i kvantitativní analýze je tedy potřeba zvolit takovou metodu, která disponuje dostatečnou rozlišovací schopností. Požadavkům vyhovuje zejména kapalinová chromatografie a kapilární elektroforéza, ostatní analytické metody jsou využívány velmi málo. Obě hlavní metody jsou využívány jak v oblasti kvantitativní, tak kvalitativní analýzy flavonoidů.

3.9.5.1. HPLC

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie byla pro analýzu flavonoidů použita už v 70. letech 20. století a v současnosti je nejpoužívanější analytickou metodou v oblasti přírodních látek. Je to metoda, která je vzhledem ke své robustnosti, propracovanosti a mnohostrannosti nejvíce používaná i pro kvalitativní i kvantitativní analytiku flavonoidních látek.

Používané kolony jsou téměř výhradně typu reverzní fáze, se stacionární zakotvenou fází C18, méně často C8. Eluční systém je nejčastěji binární, s jednou fází

vodnou a okyselenou (octová, trifluoroctová, fosforečná, mravenčí kyselina). Druhou fází bývá organické rozpouštědlo methanol či acetonitril. Derivatizace analytů není zapotřebí, protože všechny základní skupiny flavonoidů absorbují v oblasti vlnových délek kolem 210 nm. Další absorpční maxima jsou charakteristická pro jednotlivé skupiny, např. flavonoly mají dvě maxima kolem 260 a 380 nm, anthokyanidiny vzhledem ke své barevnosti dobře absorbují v oblasti kolem 520 nm, atd. Výjimkou jsou katechiny, které mimo absorpci v oblasti kolem 210 nm dále prakticky neabsorbují.

Jako detektor je nejčastěji používán spektrofotometr. V provedení DAD umožňuje snadné proměření spektra sledované látky v UV i viditelné oblasti. Pro účely kvalitativní i kvantitativní analýzy se s výhodou využívá citlivější fluorimetrický detektor nebo hmotnostní spektrometr.

Metodami využívajícími HPLC byly analyzovány nejrůznější přírodní matrice. Byl stanovován obsah flavonoidních glykosidů a aglykonů ve víně, pivě, čajích a ovocných a zeleninových šťávách (Gamache et al., 1993, Hertog et al., 1993b, McDonald et al., 1998, Goldberg et al., 1999, Ritchey a Waterhouse, 1999, Whittle et al., 1999, Chen et al., 2001, Careri et al., 2000, Tsanova-Savova a Rybarova, 2002). Analýze byly podrobeny různé druhy drobného bobulovitého ovoce (Kader et al., 1996, Häkkinen et al., 1998, Häkkinen et al., 1999). Flavonoidní aglykony a glykosidy byly analyzovány a stanovovány také v další zelenině a ovoci (Hertog et al., 1992b, Crozier et al., 1997, Justesen et al., 1998, Karakaya a El Nehir, 1999, Merken a Beecher, 2000, Sakakibara et al., 2003) a léčivých a jiných rostlinách (Liang et al., 1996, Trichopoulou et al., 2000, Justesen a Knuthsen, 2001).

3.9.5.2. CZE a MECC

Další separační metodou, která se v současnosti často využívá v analytice přírodních látek, je kapilární elektroforéza. Je to separační metoda, založená na pohybu látek nesoucích elektrický náboj v stejnosměrném elektrickém poli. Dělení se realizuje v kapiláře o průměru 25 – 75 μm a délce do 1 metru, vyrobené nejčastěji z křemene a pokryté vnější ochrannou polyamidovou vrstvou. Vnesené látky se rozdělují v pracovním pufu podle své elektroforetické mobility. Proces je možno ovlivnit např. změnou pH pracovního pufu, pracovní teplotou, velikostí vloženého napětí a použitím přídatku nevodného rozpouštědla do pracovního pufu (de Simón et al., 1995). U

flavonoidů je elektroforetická mobilita ovlivněna mimo tyto vlivy také druhem a počtem navázaných sacharidů (Mc Ghie a Markham, 1994).

Kapilární elektroforéza umožňuje dělení i málo ionizovaných sloučenin, pokud je použita varianta elektroforézy, tzv. micelární elektrokinetická chromatografie. V této metodě se do pracovního pufru přidává povrchově aktivní látka, která od určité kritické koncentrace vytváří micelární tzv. pseudostacionární fázi. K dělení látek dochází pak podle hodnoty rozdělovacího koeficientu mezi pufrem a touto micelární fází, takže metoda svým dělicím principem spíše připomíná chromatografii (Dolník, 1994, Rodríguez-Delgado et al., 2000).

Nejpoužívanějším detektorem je spektrofotometrický UV- VIS. V kvalitativní analýze se jako detektor stále více objevuje hmotnostní spektrometr.

Kapilární elektroforéza má velkou rozlišovací schopnost (počet teoretických pater až 10^5), proto se hodí k dělení pestrých směsí podobných látek jako alternativní metodika k HPLC.

Často analyzovaným vzorkem jsou vína. Zde byla s výhodou použita dělicí mohutnost elektroforézy (Gil et al., 1995, Garcia-Viguera a Bridle, 1995, Kulomaa et al., 1997, Prasongsidh a Skurray, 1998, Castellari et al., 2000, Dadáková et al., 2003).

V citrusové šťávě sloužila CZE k určení charakteristických flavonoidních zástupců (Cancalon a Bryan, 1993). Velmi často se kapilární elektroforéza používá k určení spektra flavonoidních látek v extraktech a přípravcích z léčivých rostlin (Pietta et al., 1991, Liang et al., 1996, Kulomaa et al. 1997, Liang et al., 1997, Liebich et al., 1998, Pastene et al., 2000, Cao et al., 2001, Cao et al., 2002). Metoda CZE nebo MEKC byla také použita pro analýzu flavonoidních látek v ovoci a zelenině. Podle zastoupení jednotlivých flavonoidů je možno určit původ medu (Ferrerres et al., 1994) a propolisu (Hilhorst et al., 1998). Izoflavony, flavonoidy pocházející ze sóji a mající estrogenní účinky, byly po rozdělení pomocí kapilární elektroforézou detegovány buď absorbcí v UV oblasti (Shihabi et al., 1994, Aussenac et al., 1998) nebo pomocí hmotové spektrometrie (Aramedia et al., 1995). Celkově platí, že kapilární elektroforéza je perspektivní analytickou metodou. Má malou spotřebu pracovních roztoků, doba analýzy je obvykle krátká (do 20 minut) a metoda má velkou rozlišovací schopnost. Přístroj používá k nástřiku poměrně malé množství vzorku (řádově nl). Je vhodné, aby

vzorek, který má být analyzován kapilární elektroforézou, neobsahoval příliš mnoho iontových doprovodných látek. Zde se hodí vhodná metoda zkoncentrování a přečištění vzorku před analýzou, např. metoda SPE nebo extrakce nemísitelným rozpouštědlem.

3.9.5.3. Ostatní metody

Před rozšířením technik HPLC a CZE/MEKC se jako jednoduchá kvantitativní a semi-kvalitativní metoda užívala chromatografie na papíře nebo na tenké vrstvě.

I v současnosti není tato technika zcela zavržena, neboť je jednoduchá, levná a rychlá (Soczewinski et al., 2001, Kolesnikov a Gins, 2001, Pereira et al., 2004). Komplexní směsi umožňuje dělit dvou- rozměrné uspořádání TLC (Hawryl et al., 2002).

Velmi zřídka se pro analýzu, zejména kvantitativní, používají imunologické metody (Lapčík et al., 1999). Flavonoidy vesměs nevyvolávají tvorbu specifických protilátek. Tento fakt se obchází vazbou flavonoidu na některou bílkovinu, zejména hovězí sérový albumin.

4. Cíle práce

Z provedené literární rešerše vyplynulo, že běžnou součástí každodenního jídelníčku jsou fenolické látky flavonoidy. Mezi nimi svými biologickými vlastnostmi vynikají flavonoly s hlavním zástupcem kvercetinem. Tato látka má zejména výrazné antioxidační účinky a může působit při prevenci vzniku onemocnění srdce a cév. Rutin (kvercetin-3-O-D-rutinosid) je nejznámějším glykosidem kvercetinu. Je majoritním flavonoidním glykosidem v některých rostlinách, např. pohance.

Pro stanovení obsahu rutinu a kvercetinu byla jako vhodná analytická metoda zvolena kapilární elektroforéza. Z rozdílného charakteru obou těchto látek (rutin je glykosid kvercetinu) a s ohledem na výskyt jednotlivých analytů vyplynula potřeba vyvinout pro stanovení každé látky samostatnou metodu.

Řešení bylo zaměřeno na následující cíle:

vyvinout metodu stanovení obsahu celkového kvercetinu vycházející z kyselé hydrolýzy vzorku, přečištění a zakoncentrování hydrolyzátu a analytické koncovky využívající kapilární elektroforézu,

vyvinout metodu stanovení obsahu rutinu, která bude zahrnovat extrakci, přečištění a zakoncentrování hydrolyzátu a analytické koncovky využívající kapilární elektroforézu,

stanovit obsah celkového kvercetinu v souboru vhodných rostlinných materiálů (ovoce, zelenina, nápoje a léčivé rostliny),

stanovit obsah rutinu v materiálu několika odrůd pohanky seté.

5. Experimentální část

5.1. Vzorkování

5.1.1. Ovoce a zelenina

Celkový obsah kvercetinu byl stanovován v souboru ovoce a zeleniny. Byly vybrány takové druhy, které se běžně konzumují v České republice. Vzorky byly získávány nákupem v obchodní síti nebo u drobných pěstitelů. Celkem bylo získáno 14 druhů ovoce a 15 druhů zeleniny. Vzorky byly odebírány v konzumní zralosti. Pro převoz vzorků na pracoviště byla používána termoizolační taška. Čerstvé vzorky se uchovávaly při teplotě 6 °C v chladničce nejdéle 48 hodin. Pokud bylo třeba, provedlo se povrchové očištění vodou a odstranění vody filtračním papírem. Ze vzorků byly odstraněny nejedlé části (stopky, pecky, slupky) a vzorky byly nakrájeny na kousky o tloušťce maximálně 0,5 cm. Takto bylo zpracováno 0,5 kg vzorku. Připravený materiál byl zmrazen v mikroténových sáčcích a uchován při teplotě –16 °C. Vzorek byl lyofilizován do 1 měsíce po odběru. K lyofilizaci bylo odebráno přibližně 200 g nakrájeného materiálu.

5.1.2. Vliv vybraných kuchyňských úprav na obsah kvercetinu v cibuli

Cibule kuchyňská (*Allium cepa* L.) je oblíbeným druhem zeleniny, často používaným v české kuchyni. Je to dvouletá rostlina, v prvním roce růstu produkuje jako zásobní orgán cibuli ze zdužnatělých listů. Ve střední Evropě se pěstuje hlavně cibule kuchyňská, jejíž odrůdy mají různé tvary a barvy cibulí. Zejména v západní Evropě je oblíbená cibule šalotka (*Allium ascalonicum* L.), která tvoří shluky cibulí menších rozměrů. Cibule byla vybrána jako modelový materiál pro testování vlivu kuchyňských úprav na obsah kvercetinu. Je to všeobecně používaný a oblíbený druh zeleniny a vzhledem k vysokému obsahu kvercetinu je vhodným zdrojem flavonoidů v potravě.

5.1.2.1. Obsah kvercetinu v základních odrůdách cibule kuchyňské

Pro stanovení obsahu celkového kvercetinu byly vybrány dvě odrůdy cibule kuchyňské – žlutá Všetana a červená Karmen, a cibule šalotka (odrůda neurčena). Vzorky byly pořízeny v roce 2002 u soukromého pěstitele. Porosty během vegetace byly ošetřovány běžným mechanickým způsobem a nebyly použity žádné chemické ochranné prostředky. Cibule byly zbaveny nejedlých částí a rozkrájeny na kousky maximálně 0,5 cm velké. Rozkrájený materiál (cca 150 g) byl zmražen a lyofilizován.

Pro testování vlivu kuchyňských úprav na obsah kvercetinu bylo v roce 2003 v obchodní síti zakoupeno 15 kg cibule kuchyňské určené ke skladování. Odrůda nebyla výrobcem deklarována. Ze základního vzorku bylo odebráno asi 500 g cibulí, které byly zbaveny nejedlých částí (slupky a podpučí), rozkrájeny na kousky maximálně 0,5 cm velké a po zmrazení lyofilizovány. Lyofilizovaný materiál byl rozdrcen a používán jako základní srovnávací materiál.

5.1.2.2. Vzorkování sušnic cibule

Vzorky pro tento experiment byly pořízeny z jednoho velkého exempláře cibule kuchyňské, která vážila 237 g. Z cibule bylo pořízeno 7 vzorků. V prvním vzorku byly soustředěny všechny suché slupky, další vzorky byly vždy jednotlivé sušnice. Podpučí bylo odstraněno. Všechny vzorky byly po rozkrájení a zmrazení lyofilizovány a rozemlety.

5.1.2.3. Skladování cibule

Ze zakoupené cibule byly odebrány dva vzorky po šesti kilogramech cibulí přibližně stejné velikosti za účelem skladování. Testované skladovací podmínky představovaly prostředí běžně používané pro skladování zeleniny v domácnostech. Skladování probíhalo při 6 °C v lednici a při 22 °C v temné místnosti. Každý měsíc bylo odebíráno asi 500 g cibulí. Cibule byly zbaveny nejedlých částí, rozkrájeny na kousky maximálně 0,5 cm velké a po zmrazení lyofilizovány do jednoho měsíce od odběru. Pokus trval šest měsíců.

5.1.2.4. Tepelné úpravy cibule

V roce 2004 byly zakoupeny v obchodní síti 2 kg cibule kuchyňské (odrůda nebyla prodejcem deklarována). Všechny cibule byly zbaveny nejedlých částí a rozkrájeny na kousky maximálně 0,5 cm velké a rozkrájený materiál byl promíchán. Přibližně 100 g bylo lyofilizováno, čímž byl získán základní srovnávací materiál.

Tři dávky po 35 g rozkrájeného materiálu byly pečeny na teflonové pánvi bez přidání tuku po dobu 5, 10 a 15 minut. Tím byly získány vzorky přibližně odpovídající kulinářským standardům „sklovitá, zlatá a červená“. Upravený materiál byl zvážen, lyofilizován, opět zvážen a rozdrcen ve třetí misce.

5.1.3. Vliv vybraných kuchyňských úprav na obsah kvercetinů v plodech bezu černého

Pro studium změn obsahu kvercetinů během některých kuchyňských úprav ovoce byly vybrány plody bezu černého – bezinky. Toto drobné bobulové divoce rostoucí ovoce obsahuje poměrně velké množství kvercetinů a u nás se využívá spíše jako léčivka pro terapii nachlazení a onemocnění periferního nervstva. V západní Evropě se plody bezu černého považují za cenný zdroj vitamínu C a flavonoidů a pěstují se šlechtěné odrůdy (Kaack a Austed, 1998).

Z obvyklých kuchyňských úprav byla vybrána příprava šťávy a džemu s 50 % sacharosy. Podle obvyklých receptur pro zpracování ovoce je doporučováno okyselení materiálu, nejčastěji přidávkem kyseliny citrónové. Pro zjištění vlivu okyselení na stabilitu kvercetinů byly vytvořeny dvě varianty (bez okyselení a s přidávkem 0,5 % kyseliny citrónové).

V roce 2004 byly z několika volně rostoucích porostů v jižních Čechách odebrány plně vyzrálé plody bezu černého a vytvořen směsný vzorek. Z plodenství byly odstraněny všechny stopky a z bobulí byly vytvořeny dva vzorky o hmotnosti 500 g. Dalších asi 100 g bobulí bylo odebráno pro lyofilizaci a získání základního srovnávacího materiálu.

5.1.3.1. Příprava šťávy a okyselené šťávy.

Bezinková šťáva byla připravována bez přídavku kyseliny citrónové a s přídavkem 0,5 % (m/m) kyseliny citrónové potravinářské. Vždy 500 g bobulí bylo smícháno s 500 g vody, resp. 495 g vody a 5 g kyseliny citrónové a bylo rozmixováno 5 minut ponorným mixérem v plastové kádince. Získaná homogenní směs byla prolisována přes potravinářské plastové síto, aby byly odstraněny slupky a semena. Získaná šťáva byla zvážena. Při zpracování 500 g bobulí společně s 500 g vody, resp. 495 g vody a 5 g kyseliny citrónové, bylo získáno 755 g neokyselené šťávy a 747 g okyselené šťávy. Zbytek byl odpad, který tvořily slupky a semena. Z výrobků byly odebrány vzorky k analýze, které byly okamžitě zmrazeny. Zpracování bobulí na šťávu proběhlo během jedné hodiny.

5.1.3.2. Příprava džemu a okyseleného džemu

Džem byl připravován z obou variant šťávy podle obvyklé receptury. Do skleněné kádinky bylo odváženo 200 g šťávy a přidáno 200 g sacharózy. Směs byla za stálého míchání zahřívána na síťce a od počátku varu vařena 20 minut. Poté byla ochlazená ve vodní lázni a rozdělena do dvou skleněných uzavíratelných nádob. Po ochlazení připraveného džemu byl také odebrán vzorek k základní analýze a zmražen pro pozdější současnou analýzu.

5.1.4. Skladování džemů

Podmínky skladování výrobků byly zvoleny tak, aby odpovídaly skladovacím podmínkám nejčastěji používaným v domácnostech. Každá varianta džemu byla skladována 2 měsíce v lednici při teplotě 6 °C a ve skladu při 22 °C. Odběr vzorků pro analýzu byl prováděn každých 14 dnů a odebrané vzorky byly okamžitě zmrazeny, aby posléze mohly být analyzovány současně.

5.1.5. Příprava kontrolního materiálu

V obchodní síti byly v roce 2001 pořízeny loupané plody pohanky seté (odrůda neudána). Přibližně 250 g vzorku bylo lyofilizováno, rozemleto v laboratorním mlýnku a uchováváno v uzavřené plastové vzorkovnici při -16 °C. V tomto materiálu byl

v pravidelných dvouměsíčních intervalech stanovován obsah kvercetinu a rutinu. Výsledky analýz sloužily ke kontrole stability obou metod.

5.1.6. Obsah rutinu v několika odrůdách pohanky seté a pohanky tatarky (*Fagopyrum esculentum* Moench, *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.)

Pohanka setá a pohanka tatarka patří do čeledi rdesnovitých a pochází ze Střední Asie. Jsou to staré kulturní plodiny, pěstované v současnosti zejména v Japonsku, Koreji, Číně, Rusku, Koreji a Kanadě. Výrobky z pohanky mají vysokou nutriční a dietetickou hodnotu. Z agronomického hlediska je ceněna obecná nenáročnost na pěstitelské podmínky a krátká vegetační doba. U nás v současnosti stoupá zájem o její pěstování v souvislosti s vhodností pohankových produktů pro alternativní způsoby výživy.

Ke stanovení rutinu bylo vybráno pět odrůd pohanky seté : Pyra (Česká republika), Emka (Polsko), Hruszowska (Polsko), Kora (Polsko), Krupinka (Rusko) a jedna odrůda pohanky tatarky (Z51-0014). Rostliny byly pěstovány v rocích 2001 až 2003 na pokusných pozemcích ZF JU v Českých Budějovicích (380 m n.m., kambizem kyselá, oglejená, písčitohlinitá). Výsev byl proveden do řádků širokých 12,5 cm při hustotě porostu 200 rostlin na metr čtvereční ve čtyřech opakováních. Osivo bylo vyséváno ve všech experimentálních rocích zhruba v polovině května. Během vegetace nebylo provedeno žádné mechanické ani chemické ošetření.

Rostlinný materiál byl odebírán v plném květu kolem začátku července, plody v plné zralosti v září. Od každé odrůdy bylo odebráno po pěti rostlinách z každého ze čtyř opakování. Bezprostředně po odběru byly rostliny rozděleny na části určené k analýze (květy, listy, stonky), zmrazeny při -16°C a lyofilizovány do 1 měsíce po odběru. Plody těchto odrůd byly sklizeny na podzim stejného roku v optimální zralosti a po lyofilizaci byly rozdrceny v laboratorním mlýnku.

5.1.7. Léčivé a jiné užitkové rostliny

Používání léčivých rostlin hrálo významnou roli v zachování lidského zdraví po tisíce let. Dodnes tradiční léčebné preparáty na rostlinné bázi vhodně doplňují používaná syntetická léčiva. Podrobnější informace o zastoupení zajímavých

fytochemikálií však většinou chybí. Mezi účinné složky mnoha léčivек patří i flavonoidy.

5.1.7.1. Bez černý (*Sambucus nigra* L.)

Bez černý (*Sambucus nigra* L.) je původní v kontinentální Evropě a na Britských ostrovech, chybí v jižních oblastech Španělska, severním Skotsku, Islandu a severních oblastech skandinávských států. V Asii se vyskytuje v Turecku a oblastech kolem Černého moře. V Africe je rozšířen v nejsevernějších oblastech Alžírsko a Maroka. Bez černý byl zanesen do dalších oblastí v Asii, Severní Americe, Nového Zélandu a Austrálie (Atkinson a Atkinson, 2002).

Bez černý je oficiální léčivkou zařazenou do Českého lékopisu a v lidovém léčitelství se používá při nemocech z nachlazení a onemocnění dýchacích cest. Je to rozložitý keř, hojně rostoucí u plotů, na rumišťích, v lesích, hájích a křovinách. Kvete v květnu až červnu. Bohatá květenství jsou smetanově bílá a intenzivně voní (Korbelář a Endris, 1985). Plody jsou tmavofialové bobule a dozrávají v září až říjnu.

Účinné látky květu zahrnují těkavé terpenické látky, flavonoidní glykosidy (hlavně rutin), sambunigrin, fenolické kyseliny, cholin a třísloviny. V plodech bylo nalezeno značné množství organických kyselin a anthokyanů, významný je též obsah vitamínů A a C. Data o obsahu fenolických látek jsou nepřesná a informace o změnách obsahu těchto látek během běžného kuchyňského zpracování materiálu chybí.

Vzorky květenství černého bezu ke stanovení kvercetin a rutinu byly odebrány z volně rostoucího bezu černého v květnu 2003. Lokalita sběru se nacházela v intravilánu města České Budějovice asi 500 m od nejbližší frekventované komunikace. Materiál byl sbírán za slunečného dne, květenství obsahovala asi 50 % rozvitých kvítků. Byly odebrány dva kilogramy květenství. Bezprostředně po sběru byl materiál zbaven nejtlustších stopek, které se farmaceuticky nevyužívají. Část materiálu byla usušena volně na filtračním papíru při laboratorní teplotě 22 °C a uchovávána v uzavřené vzorkovnici při -16 °C. Část čerstvého materiálu byla bezprostředně zmrazena a lyofilizována do jednoho měsíce po sběru. Z čerstvého materiálu byly připraveny kvašené nápoje (šumivý nápoj, víno) podle tradiční receptury, z volně sušeného květu čaj, který je nejběžnější farmaceuticky používanou formou.

5.1.7.2. Příprava nápojů z květenství bezu černého

Z čerstvého materiálu květu bezu černého byly připraveny fermentované nápoje a čaj ve formě nálevu. Všechny nápoje byly připravovány podle obvyklých postupů s použitím běžné pitné vody.

5.1.7.2.1. Příprava šumivého nápoje

Do skleněné nádoby o obsahu 3,5 l bylo vloženo 3000 ml převařené pitné vody, 350 g sacharózy, 100 g citronu bez kůry nakrájeného na plátky, 50 g čerstvých bezových květů, 2,5 g kyseliny citrónové, 0,5 g fosforečnanu draselného a 0,3 g sušených vinných kvasinek. Směs byla ponechána při laboratorní teplotě 22 °C sedm dnů pod prodyšným uzávěrem z dvojité vrstvy gázy, poté zfiltrována přes filtr ze skleněných vláken. Bylo získáno 2190 ml produktu. Vzorek filtrátu byl uchováván při teplotě –16 °C do analýzy v plastové vzorkovnici.

5.1.7.2.2. Příprava vína

Do skleněné nádoby o obsahu 3,5 l bylo vloženo 2800 ml převařené pitné vody, 700 g sacharózy, 100 g citronu bez kůry nakrájeného na plátky, 50 g čerstvých bezových květů, 2,5 g kyseliny citrónové, 1,0 g fosforečnanu draselného, 0,6 g sušených vinných kvasinek. Směs byla ponechána při teplotě 22 °C čtrnáct dnů pod kvasným uzávěrem, poté zfiltrována přes filtr ze skleněných vláken. Bylo získáno 2106 ml produktu. Vzorek filtrátu byl uchováván při teplotě –16 °C do analýzy v plastové vzorkovnici.

5.1.7.2.3. Příprava čaje

Pro přípravu čaje byla zvolena dávka materiálu obvykle používaná pro přípravu nápoje z léčivých rostlin, která činí 1,5 až 2,5 g. Bylo naváženo 2,1 g volně sušeného nehomogenizovaného květu bezu černého, zalito 250 ml právě vroucí vody a ponecháno louhovat 15 minut. Po této době byl čaj zfiltrován přes filtr ze skleněných vláken a ochlazen během 5 minut studenou vodou. Bylo získáno 205 ml filtrátu pro stanovení fenolických látek. Vzorek filtrátu byl do analýzy uchováván při teplotě -16 °C.

5.1.7.3. Rozdělení květenství na jednotlivé části

250 g květenství zbaveného nejtlustších stopek bylo volně sušeno 5 dnů při teplotě 22 °C na podložce z filtračního papíru. Poté byly odděleny jednotlivé květy (40,22 g, 81,9 %), tenké stopky (7,81 g, 15,9 %) a pyl (1,06 g, 2,20 %) a tyto části květenství byly rozdraceny v laboratorním mlýnku.

5.1.7.4. Sušení černého bezu při různých podmínkách

V květnu 2004 bylo z volně rostoucích keřů bezu černého v okolí Českých Budějovic odebráno asi 4,5 kg květenství bezu černého. Materiál byl odebírán v době, kdy květenství obsahovala přibližně 50 % rozvitých květů za suchého dne a byl do 3 hodin po odběru zpracován. Z květenství byly odstraněny nejtlustší stopky. Z čerstvého materiálu byl odebrán vzorek asi 150 g, který byl po bezprostředním zmrazení lyofilizován. Ze zbývajících materiálů byly odděleny tři části po 500 g, z nichž každá byla sušená při jiném režimu sušení. Byly zvoleny následující režimy: sušení za laboratorní teploty (22 °C) a sušení v sušárně při 30 °C a 50 °C. Během sušení byl materiál vážen a po dosažení konstantní hmotnosti bylo sušení ukončeno. Sušení při teplotě 22 °C trvalo 5 dnů a představuje nejrozšířenější způsob sušení léčivků. Získaný suchý materiál měl zachovanou původní barvu s béžovým podtónem. Sušení v sušárně při teplotě 30 °C je doporučeným režimem sušení pro tuto značně choulostivou léčivku a trvalo 15 hodin. Suchý materiál měl původní smetanovou barvu. Sušení při teplotě 50 °C trvalo 8 hodin a materiál při něm získal silně okrovou barvu. Usušený materiál byl rozemlet a do analýzy uchováván v uzavřených vzorkovnicích.

5.1.7.5. Dlouhodobé skladování bezu černého

Materiál z černého bezu sušený při třech různých teplotách byl použit na dlouhodobou skladovací studii. Homogenní materiál byl umístěn do uzavřených plastových vzorkovnic, které byly skladovány 1 rok v temnu při teplotě 22 °C. Vzorky k analýze obsahu rutinu byly odebírány po uplynutí 1,5; 3, 6 a 12 měsíců skladování.

5.1.7.6. Křídlatka (*Reynoutria ssp.*)

Rostlina křídlatka (*Reynoutria ssp.*) je invazním druhem, který se šíří do České republiky z Asie. U nás rostou druhy: křídlatka japonská (*Reynoutria japonica* Houtt.), křídlatka sachalinská (*Reynoutria sachalinensis* (F.Schmidt.) Nakai) a kříženec předešlých dvou druhů - křídlatka česká (*Reynoutria x bohemica* (Chrtek et Chrtkova)).

Usušený materiál křídlatky byl poskytnut RNDr. Naděždou Vrchotovou, CSc. z Ústavu systémové biologie a ekologie AV ČR v Českých Budějovicích.

Tyto vzorky byly odebrány z volně rostoucích rostlin jednotlivých druhů křídlatky v jižních Čechách v roce 2003. Byl odebrán čerstvý materiál z pěti exemplářů každého druhu křídlatky, rozdělen na části k analýze (květ, stonek, list) a usušen za laboratorní teploty do konstantní hmotnosti. Usušený materiál byl homogenizován na laboratorním mlýnku. Výsledný vzorek k analýze byl získán smícháním stejných hmotnostních dílů materiálu z jednotlivých exemplářů křídlatky a byl skladován do analýzy při $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.1.8. Nápoje

Analyzované vzorky představují běžně konzumované druhy nápojů. Mezi analyzované vzorky byly zařazeny tři základní typy českých piv, nápoje s obsahem jablečné šťávy a šťávy z černého rybízu a červené víno. Dalším materiálem bylo osm druhů čajů, zahrnujících čaje pravé černé a zelené, čaj roibos, bylinnou směs proti nachlazení a jeden druh čaje ovocného.

5.1.8.1. Čaje

Vzorky sypaných čajů různých značek byly získány z obchodní sítě. Byly analyzovány tři druhy černého, dva druhy zeleného čaje a čaj roibos, který se vyrábí z čajovníkovce kapského (*Aspalthus linearis* (Burm.F.) R.Dahlgren). Bylinná čajová směs proti nachlazení byla zakoupena v lékárně a představuje směs oblíbených léčivých bylin s květem lípy a černého bezu. Ovocné čaje obsahují podle složení deklarovaného výrobcí nejčastěji plod šípku, květ ibišku a velmi malé množství sušeného ovoce. Příchuť je vytvářena přidávkem aromatických látek, které obsah flavonoidů neovlivní. Z velkého množství nabízených ovocných čajů byl vybrán druh Lesní plody.

Pro stanovení celkového obsahu kvercetinu byla část vzorku rozdrobena ve třecí misce a uchováván do analýzy v uzavřené vzorkovnici při $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$. Na přípravu nálevů z čajů bylo použito 1,5 g (obvykle doporučená dávka) sypaného čaje nebo 1 sáček porcovaného čaje. Čaj byl zalit 250 ml vroucí pitné vody a 5 minut vyluhován. Vylouhovaný čaj byl scezen přes husté plastové sítko do 400 ml kádinky a ochlazen ve vodní lázni na teplotu asi $22\text{ }^{\circ}\text{C}$. Objem nápoje byl změřen. Vzorek o objemu asi 100 ml byl uchováván při teplotě $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$ v plastové vzorkovnici do analýzy.

5.1.8.2. Ostatní nápoje

Komerčně dostupné nápoje (džusy, pivo) byly pořizovány v obchodní síti, vzorky červeného vína byly získány od výrobce ve spolupráci s Ústavem systémové biologie a ekologie AV ČR. Pokud bylo potřeba, po otevření originálního obalu byl odebrán vzorek o objemu 50 ml, který byl uchováván do analýzy při teplotě $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$ v plastové vzorkovnici. Vzorky piva byly zbaveny oxidu uhličitého 10 minut trvajícím odplyněním na ultrazvukové lázni.

5.2. Lyofilizace a homogenizace

Čerstvý rostlinný materiál se nedal dlouho skladovat a bylo nutno ho zbavit vody. Jako vhodný způsob sušení byla vybrána lyofilizace. Lyofilizace probíhala u všech vzorků při teplotě $-46\text{ }^{\circ}\text{C}$ a tlaku 25 Pa po dobu 24 hodin. Část vody nicméně materiál lyofilizací neztrácí (voda vázaná). Sušit rostlinný materiál při vyšších teplotách však pro účely metody není vhodné, protože probíhají nežádoucí chemické změny materiálu. Všechny vzorky (s výjimkou nápojů a šťáv) určené ke stanovení rutinu a kvercetinu byly zbaveny vody lyofilizací a výsledky jsou tedy udávány v mg analytu na 1 kg lyofilizované sušiny nebo po přepočtu na 1 kg čerstvého materiálu. Pro účely výpočtu sušiny vzorku byl materiál vážen před lyofilizací a po ní.

5.3. Uchovávání vzorků

Lyofilizované materiály byly rozdrobeny v laboratorním mlýnku Grindomix (20 s, 7500 otáček za minutu) a do analýzy uchovávány v uzavřených plastových

vzorkovnicích při teplotě -16 °C. Podle literatury (Hertog et al.,1992a) je takto upravený materiál minimálně 1 rok stabilní.

5.4. Použité analytické metody

Pro stanovení celkového obsahu kvercetinu v rostlinném materiálu a v nápojích a stanovení obsahu rutinu v rostlinném materiálu byly sestaveny a optimalizovány analytické metody. Pracovní postupy jsou uvedeny v kapitole 6.1.5. Optimalizované pracovní postupy.

5.5. Použité statistické metody

Ke zpracování výsledků byly použity běžné statistické metody. Pro výpočet průměrných hodnot, hodnot směrodatných odchylek a linearizace kalibračních závislostí metodou nejmenších čtverců byly použity nástroje programu MS Excel. Test linearity byl proveden podle příslušné normy (ČSN ISO 8466-1, 1993). Nástroje programu MS Excel byly použity pro analýzu rozptylu s porovnáním pomocí t-testu.

5.6. Použité chemikálie

5.6.1. Použité chemikálie a materiál

Všechny použité chemikálie jsou čistoty p.a., pokud není uvedeno jinak.

sada laboratorního skla, Fisher Scientific, Pardubice, ČR

tetraboritan sodný, Sigma Chemicals, USA

laurylsíran sodný Sigma Chemicals, USA

kyselina boritá, Lachema, ČR

kyselina chlorovodíková, Lachema, ČR

hydroxid sodný, Lachema, ČR

hydrogenuhličitan sodný, Lachema, ČR

1-naftyloctová kyselina, Lachema, ČR

kyselina L-askorbová Merck, Německo

kvercetin Aldrich Chemie, Německo

rutin Sigma Chemicals, USA

methanol p.a. Penta Chrudim, ČR

5.6.2. Použité přístroje a zařízení

analytické váhy AB 204, Mettler Toledo, Švýcarsko

technické váhy Kern, Německo

lyofilizátor Alpha 1-2, Christ, Německo

kombinovaná lednička s chladničkou Bosch Cooler, Německo

sušárna Memmert, Německo

SPE izolační jednotka, vývojové dílny JU, Česká republika

laboratorní mlýnek Grindomix GM 20, Retsch, Německo

zařízení na úpravu deionizované vody Premier WM-50-R.O.A., Premier System, USA

kapilární elektroforéza SpectraPhoresis 2000, Thermo Separation Product, USA

vodní lázeň termostatovaná míchaná EL-20 R, Kavalier, ČR

pipety automatické, objem 20-200 μ l a 100-1000 μ l Transferpette, Treff AG, Švýcarsko

digitální pipeta Finnpiquette Biocontrol, Thermo Labsystem, Finsko

dávkovač kapalin 5 ml, Sklo Union, ČR

odstředivka Sigma 2-5, Sigma Laborzentrifugen, Německo

pH-metr Inolab-1, s elektrodou SenTix 61, WTW, Německo

SPE kolonky RP-18, RP-18E, CN, SI, NH₂, Merck, Německo

SPE kolonky Strata-X, Phenomenex Inc., USA

ultrazvuková lázeň Sonorex RK 31, Německo

filtrační papír Filtrak, Filtrak GmbH, Německo

filtry ze skleněných vláken GF/C, Whatman, Velká Británie

5.7. Pracovní podmínky SpectraPhoresis 2000

Pro analýzu rutinu a kvercetinu v přístroji pro kapilární elektroforézu SpectraPhoresis 2000 byla ve všech případech používána křemenná kapilára (CElest FS75, Supelco, USA) celkové délky 70 cm, efektivní délky k detektoru 67 cm, o vnitřním průměru 75 μ m. Nová kapilára byla podrobena mycímu procesu v trvání 5 minut pomocí 1 mol.l⁻¹ roztoku NaOH při 45 °C, 5 minut 0,1 mol.l⁻¹ roztoku NaOH při 45 °C a 20 minut deionizovanou vodou při 25 °C. Veškeré analýzy probíhaly při

následujících pracovních podmínkách: napětí 20 kV a teplota 25 °C. Nástřík byl hydrodynamický a trval 2 sekundy.

5.7.1. Údržba kapiláry

Poměrně velká péče byla vždy věnována údržbě kapiláry. Dělicí proces je závislý na ξ -potenciálu, jehož zdrojem jsou volné silanolové skupiny na vnitřním povrchu kapiláry. Pokud dojde k sorpci uvnitř kapiláry, není elektroosmotický tok vyvolaný ξ -potenciálem podél celé kapiláry konstantní a výsledkem bývá snížení reprodukovatelnosti retenčních časů, projevující se zejména jejich prodlužováním. Tento problém se objevoval hlavně u vzorků barevného ovoce a musel být řešen zařazením vhodného mycího procesu mezi jednotlivé analýzy.

Ukázalo se, že mezi jednotlivými analýzami je vhodné vkládat mytí pomocí 0,1 mol.l⁻¹ roztoku HCl. Typický mycí proces, používaný při analýzách, zahrnoval mytí následujícími roztoky: 2 minuty 0,1 mol.l⁻¹ HCl při 45 °C, 2 minuty 0,1 mol.l⁻¹ NaOH při 45 °C a 5 minut vodou při 25 °C. Pokud i při tomto režimu mytí se retenční časy prodlužovaly, bylo zařazeno razantnější mytí pomocí jednomolárních roztoků HCl a NaOH při teplotě 60 °C.

5.7.2. Příprava pracovních pufrů

Pro přípravu 1 litru základního borátového pufru bylo na analytických vahách naváženo 0,618 g kyseliny borité a 3,81 g tetraboritanu sodného. Navážené chemikálie byly rozpuštěny ve vodě a kvantitativně převedeny do odměrné baňky o objemu 1 litr. Hodnota pH tohoto roztoku byla 9,2.

Pro přípravu 1 litru základního borátového pufru s 15 % methanolu (v/v) bylo na analytických vahách naváženo 0,618 g kyseliny borité, 3,81 g tetraboritanu sodného a 150 ml methanolu. Chemikálie byly rozpuštěny ve vodě a kvantitativně převedeny do odměrné baňky o objemu 1 litr.

Pro přípravu 0,25 litru základního borátového pufru s 15 % methanolu (v/v) a 20 mmol.l⁻¹ laurylsíranu sodného (SDS) bylo na analytických vahách naváženo 0,155 g kyseliny borité, 0,953 g tetraboritanu sodného, 1,44 g SDS a 37,5 ml methanolu.

Chemikálie byly rozpuštěny ve vodě a kvantitativně převedeny do odměrné baňky o objemu 0,25 litru. Hodnota pH tohoto roztoku byla 9,2.

5.7.3. Stanovení a úprava pH

Roztoky, u kterých bylo potřeba upravit hodnotu pH, byly umístěny do přiměřeně velké kádinky a za míchání na elektromagnetické míchačce a stanovení hodnoty pH potenciometricky byla hodnota pH upravena pomocí 1 mol.l⁻¹ roztoku NaOH nebo 1 mol.l⁻¹ roztoku HCl.

6. Výsledky a diskuse

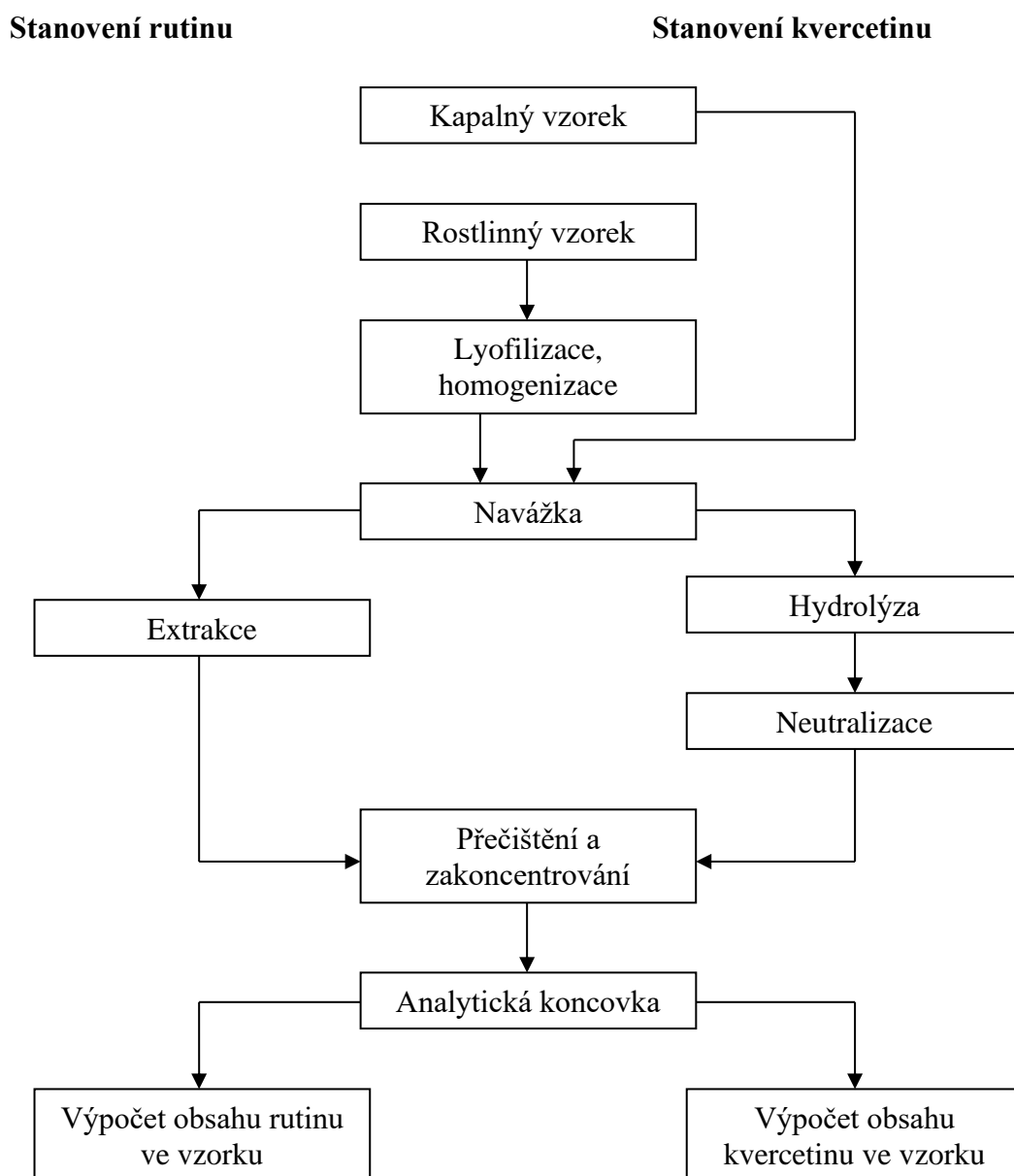
6.1. Vývoj metody

Cílem této části práce bylo vyvinout analytickou metodu vhodnou pro analýzu flavonoidů kvercetin a rutin v různých typech rostlinného materiálu (potravin, zemědělské plodiny). Z rozdílného charakteru obou těchto látek (rutin je glykosid kvercetin) vyplývá jejich rozdílný výskyt a rozdílné zacházení se vzorky. Kvercetin se v rostlinném materiálu vyskytuje téměř výhradně vázaný na molekulu sacharidu v různých glykosidech. Výskyt volného kvercetin (nenavázaného na sacharid v libovolném glykosidu) je méně častý, ale možný. Rostlinný materiál obsahuje zároveň zpravidla větší počet glykosidů, ale jejich koncentrace jsou nízké. Proto je účelné provést hydrolyzu těchto glykosidů a stanovit obsah celkového kvercetin.

Rutin (kvercetin-3-O-D-rutinosid) je nejznámějším glykosidem kvercetin. Je majoritním flavonoidním glykosidem v některých rostlinách, např. pohance.

Z uvedených charakteristik analyzovaných látek vyplynula nutnost vyvinout pro každou z nich samostatný postup zpracování analyzovaného rostlinného materiálu. Některé části postupu jsou však pro obě metody stejné. Pro lepší přehlednost byly základní kroky obou metod graficky znázorněny v následujícím schématu (obrázek 1).

Obrázek 1. Schéma návrhu metod stanovení kvercetinu a rutinu



Z navrženého schématu je zřejmé, že oběma metodám je společná úprava vzorku, přečištění extraktu, resp. hydrolyzátu a analytická koncovka. Rozdílné kroky zahrnují extrakci při stanovení rutinu a hydrolýzu a neutralizaci při stanovení kvercetinu.

6.1.1. Výběr a optimalizace analytické koncovky

Podle výsledků literární rešerše jsou přírodní polyfenolické látky nejčastěji extrahovány organickým rozpouštědlem ze vzorku a jako analytická koncovka je použita metoda s dostatečnou dělicí schopností, vhodná pro dělení směsí látek podobných vlastností. To je nejčastěji kapalinová chromatografie (HPLC), ale postupně se díky některým výhodám stále více prosazuje kapilární elektroforéza.

6.1.1.1. Volba přístroje

Jako analytická koncovka byla zvolena kapilární zónová elektroforéza (CZE). Tato moderní separační metoda se s výhodou používá pro analýzy přírodních vzorků, kde se uplatňuje její vysoká rozlišovací schopnost. Výhodou je též malá spotřeba pracovních roztoků. Přístroj SpectraPhoresis 2000, vybraný pro práci, byl již na katedře chemie JU s úspěchem použit pro analýzu biogenních aminů.

6.1.1.2. Volba a optimalizace pracovního elektrolytu

V první řadě bylo potřeba zvolit optimální složení pracovního pufru a ověřit chování rutinu a kvercetinu v tomto systému. Pro analýzu polyfenolů se jako nejvhodnějším pracovním elektrolytem jevil alkalický pufr.

Jako výchozí elektrolyt byl zvolen borátový pufr o složení 10 mmol.l^{-1} tetraboritanu sodného a 10 mmol.l^{-1} kyseliny borité. Tento základní roztok byl dále modifikován úpravou hodnoty pH, přidavkem nevodného rozpouštědla a přidavkem povrchově aktivní látky.

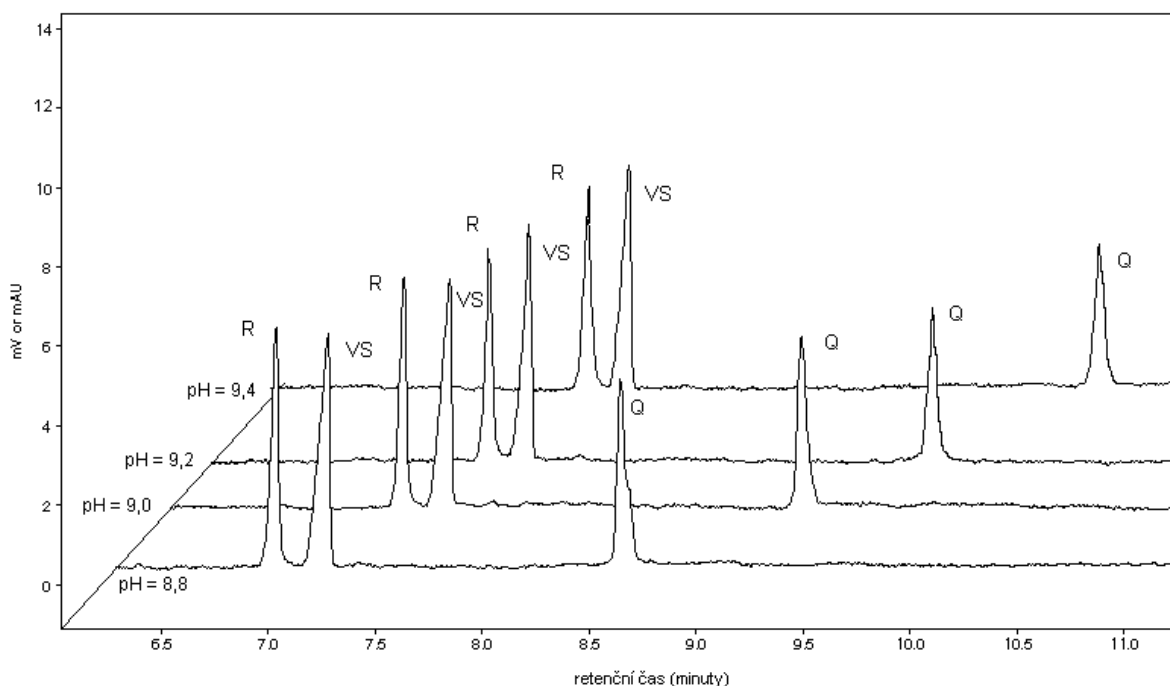
6.1.1.2.1. Nastavení hodnoty pH základního pufru

Hodnota pH je v kapilární elektroforéze důležitým parametrem pracovního elektrolytu. Pufry s hodnotou pH větší než 7 poskytují dostatečnou velikost elektroosmotického toku, vhodnou pro dělení složitých přírodních směsí.

Základní borátový pufr o složení 10 mmol.l^{-1} tetraboritanu sodného a 10 mmol.l^{-1} kyseliny borité má hodnotu pH 9,2. Při použití tohoto pufru došlo k dobrému rozdělení rutinu i kvercetinu. Pokud byla ke standardům přidána kyselina

1-naftyloctová jako vnitřní standard, ukázala se potřeba další optimalizace složení pufru. Při vývoji metodiky byl testován vliv různých hodnot pH na chování analytů při analýze. Byly připraveny pufrы se stejným složením 10 mmol.l^{-1} kyseliny borité a 10 mmol.l^{-1} tetraboritanu sodného, ale s rozdílnou hodnotou pH, která se pohybovala od 8,8 po 9,4. Celková doba analýzy směsného vzorku, obsahujícího koncentraci rutinu $100 \text{ }\mu\text{g/ml}$, kvercetin $50 \text{ }\mu\text{g/ml}$ a vnitřního standardu kyseliny 1-naftyloctové $200 \text{ }\mu\text{g/ml}$, byla kratší než 10 minut. Bylo zjištěno, že zvyšující se pH pufru způsobuje prodlužování retenčního času obou analytů. Nejkratší retenční časy poskytuje analýza v pufru o pH 8,8, analýzou v pufru o pH 9,4 se retenční časy prodlouží nejvíce. (viz obrázek 2, respektive tabulka 1).

Obrázek 2. Závislost délky retenčního času rutinu (R), kvercetin (Q) a vnitřního standardu (VS) na pH pracovního pufru



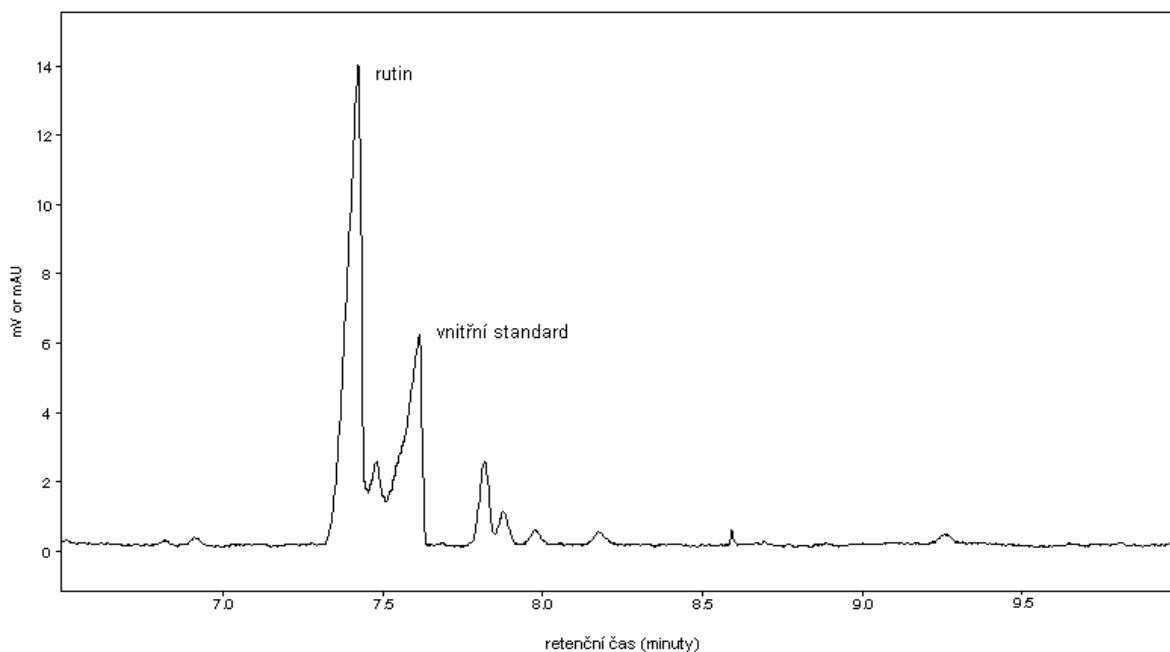
Tabulka 1 Závislost délky retenčního času na pH pracovního pufru

pH pufru	retenční čas (min)		
	rutin	vnitřní standard	kvercetin
8,8	7,038	7,281	8,645
9,0	7,377	7,591	9,132
9,2	7,514	7,703	9,576
9,4	7,711	7,904	10,093

Vzhledem k tomu, že úprava pH neměla výrazný vliv na rozdělení píků rutinu a vnitřního standardu, nebylo pH pufru upravováno a bylo ponecháno na výchozí hodnotě 9,2.

Rozdíly v retenčních časech rutinu a vnitřního standardu byly poměrně malé. Vzhledem k tomu, že reálné vzorky mohou obsahovat další neznámé píky (obrázek 3), které by s analyty mohly interferovat a znemožňovat tak odečet, byla dále testována možnost prodloužení retenčních časů analytů, a to přidavkem nevodného rozpouštědla do základního pufru. Pro další optimalizace byl používán pufr s hodnotou pH = 9,2.

Obrázek 3. E-gram vzorku pocházejícího ze stonku pohanky seté, odrůda Aelita

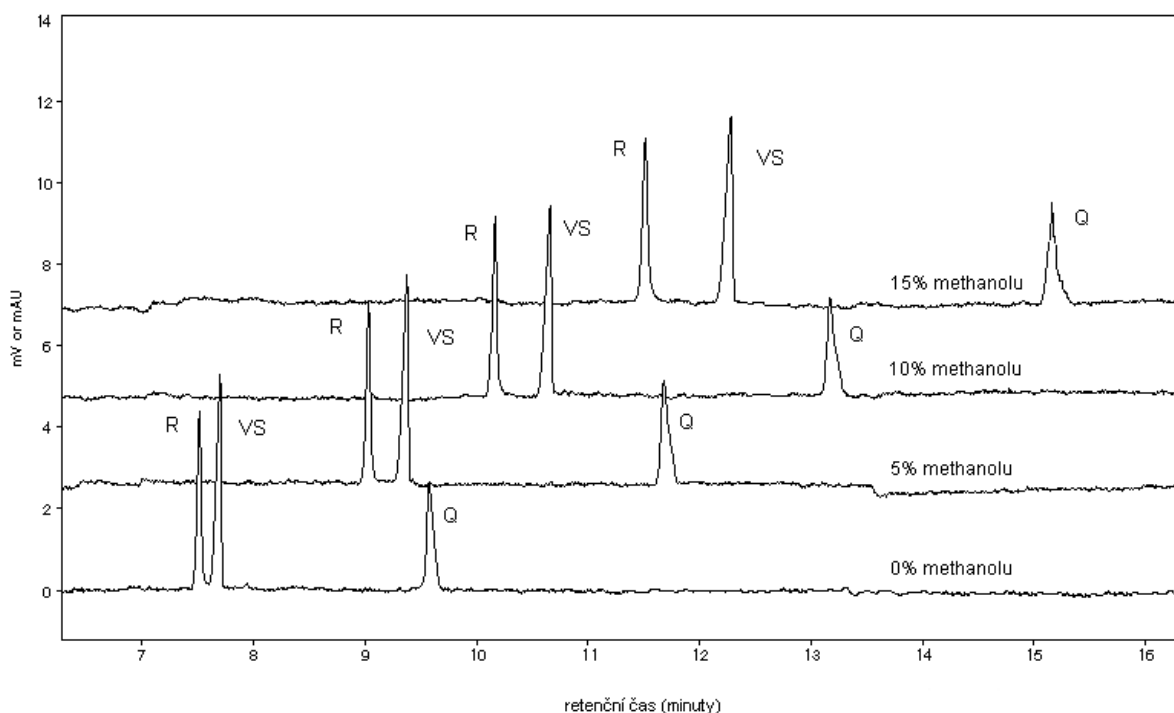


6.1.1.2.2. Přídavek nevodného rozpouštědla do základního pufru

Pro ovlivnění elektroforetické separace je běžným postupem přidavek nevodného rozpouštědla. Změna solvatace separovaných látek ovlivňuje jejich pohyblivosti a tak může přispět k jejich úspěšnému dělení.

Jako nevodné rozpouštědlo byl zvolen methanol. Při vývoji metodik byl testován základní borátový pufr bez přídavku methanolu, dále pak s 5, 10 a 15 % (v/v) methanolu. Ukázalo se, že vlivem přídavku této látky do základního elektrolytu došlo k mnohem výraznějším změnám retenčních časů než při změně pH (obrázek 4, respektive tabulka 2). Při obsahu methanolu 15 % (v/v) již došlo k dostatečnému oddálení píku rutinu a vnitřního standardu. Další zvyšování obsahu methanolu by vedlo k přílišnému prodloužení délky analýzy.

Obrázek 4. Závislost délky retenčního času rutinu (R), kvercetinu (Q) a vnitřního standardu (VS) na přídavku methanolu k základnímu pufru



Tabulka 2 Závislost délky retenčního času na obsahu methanolu v pracovním pufru bez SDS

obsah methanolu (%)	retenční čas (min)		
	rutin	vnitřní standard	kvercetin
0	7,514	7,703	9,596
5	9,034	9,375	11,808
10	10,375	10,913	14,149
15	11,931	12,752	16,328

6.1.1.2.3. SDS v pracovním elektrolytu

Laurylsíran sodný (sodium dodecyl sulfát, SDS) je povrchově aktivní látka, která je schopná od určité koncentrace vytvářet v roztoku micely. Micely mají hydrofobní vnitřek, avšak jejich povrch je polární. Analyzované látky vstupují do micely podle svého rozdělovacího koeficientu. Metoda kapilární elektroforézy využívající přídavek micelotvorné látky k pracovnímu pufru je označována jako micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MEKC).

Byl testován přídavek 20 mmol.l⁻¹ SDS k základnímu borátovému pufru s různým obsahem methanolu. Bylo zjištěno, že přídavek SDS vede k dalšímu mírnému prodloužení retenčních časů u všech sledovaných látek u všech koncentrací methanolu (tabulka 3).

Významným důsledkem přídavku SDS do pracovního pufru byla zvýšená reprodukovatelnost retenčních časů. Bylo provedeno 15 měření standardu kvercetinu v borátovém pufru s 15 % (v/v) methanolu s přídavkem, resp. bez přídavku 20 mmol.l⁻¹ SDS. V prvním případě (bez SDS) byla relativní směrodatná odchylka (RSD) retenčního času kvercetinu 5,4 %. Ve druhém případě, po přídavku SDS, hodnota RSD retenčního času klesla na 0,55 %.

Tabulka 3 Závislost délky retenčního času na obsahu methanolu v pracovním pufru s SDS

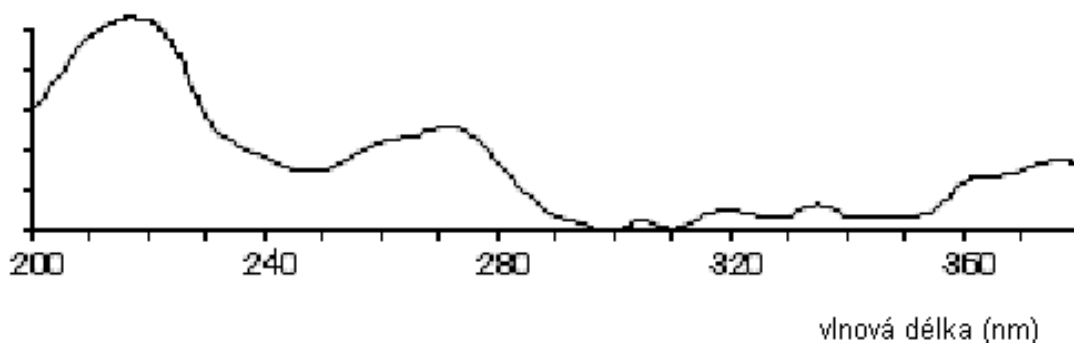
obsah methanolu (%)	retenční čas (min)		
	rutin	vnitřní standard	kvercetin
0	7,920	8,232	10,031
5	9,383	9,907	12,425
10	10,815	11,540	14,316
15	13,121	14,298	17,800

6.1.1.3. Volba optimální pracovní vlnové délky detektoru

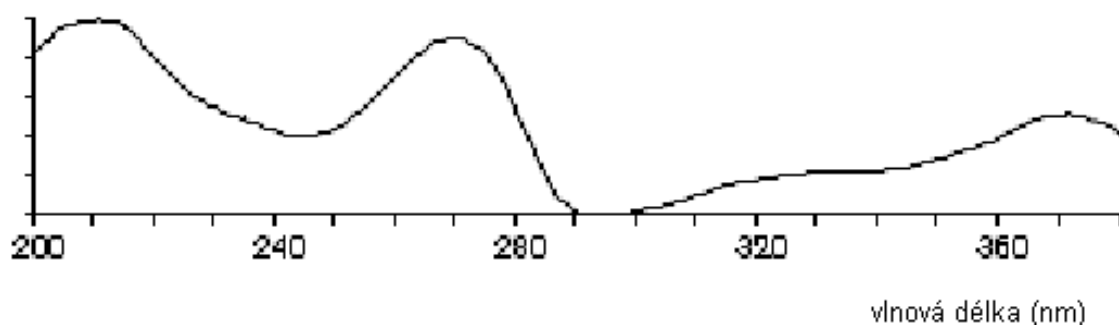
K nalezení optimálních podmínek UV detektoru (absorpční maximum) pro detekci sledovaných látek byla využita možnost přístroje SpectraPhoresis 2000 zaznamenávat v průběhu analytického měření kompletní absorpční spektrum.

K testovacím analýzám byly použity roztoky sledovaných látek v methanolu (kvercetin 50 µg/ml, rutin 100 µg/ml a kyselina 1-naftyloctová 200 µg/ml). Měření bylo provedeno za standardních podmínek (borátový pufr, 15 % (v/v) methanolu, 20 mmol.l⁻¹ SDS, pH 9,2, napětí 20 kV, teplota 25°C). Byla sledována absorpce v rozmezí vlnových délek 200-380 nm (obrázky 5, 6 a 7).

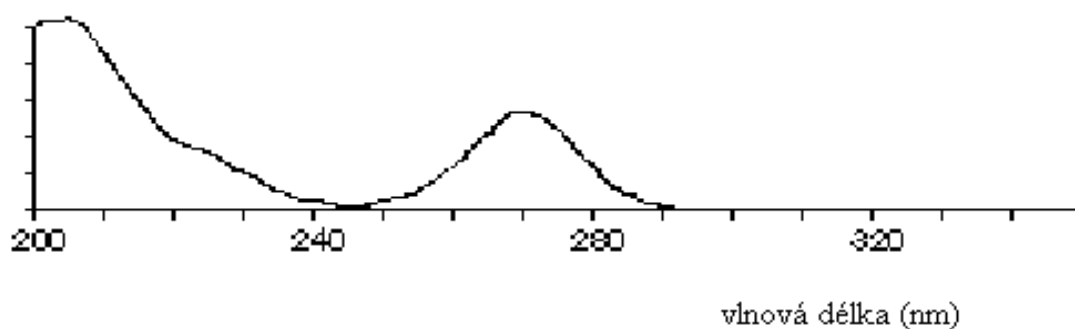
Obrázek 5. Absorpční spektrum kvercetinu



Obrázek 6. Absorpční spektrum rutinu



Obrázek 7. Absorpční spektrum kyseliny 1-naftyloctové



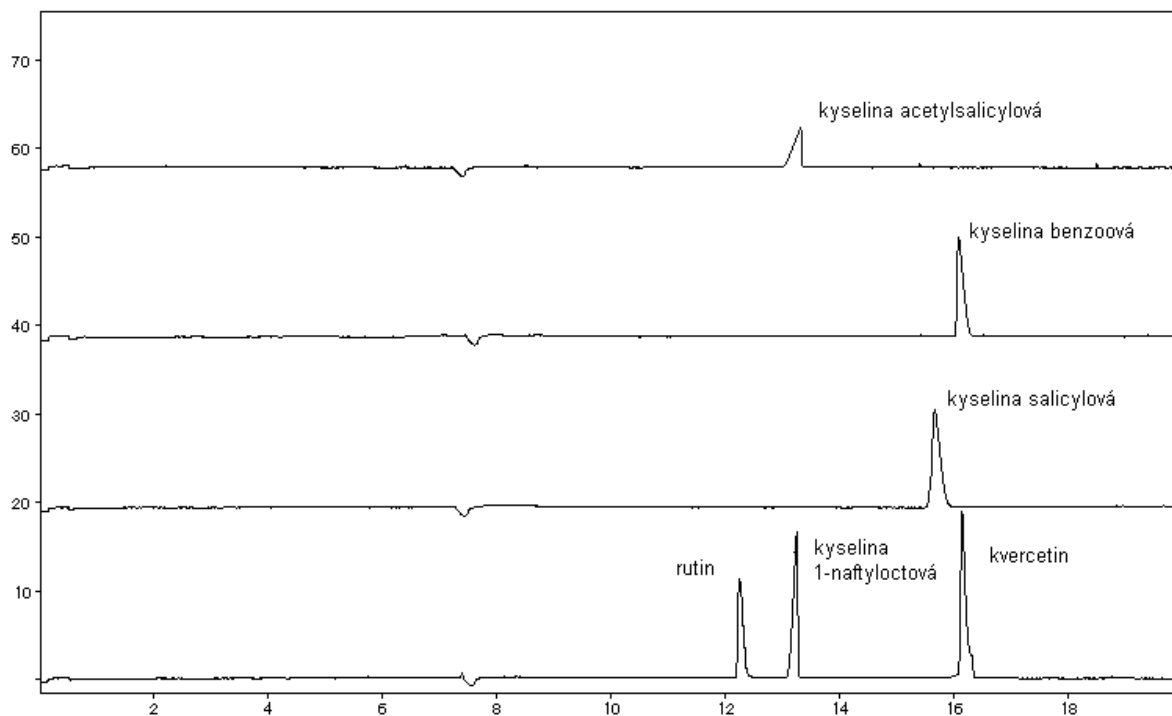
V tomto oboru vlnových délek oba analyty i vnitřní standard vykázaly lokální absorpční maximum při vlnových délkách 220 a 270 nm. Protože při vlnové délce 220 nm byla pozorována větší úroveň šumu, byla pro další měření vybrána vlnová délka 270 nm.

6.1.1.4. Volba vnitřního standardu

Běžným způsobem dávkování vzorku v kapilární elektroforéze je hydrodynamické dávkování. Tento způsob je používán ve všech vyvinutých metodách, protože je instrumentálně nejjednodušší. Nevýhodou u tohoto způsobu dávkování je spíše nižší reprodukovatelnost nadávkovaného objemu. Tento nedostatek je možno korigovat přidávkem vnitřního standardu k analyzovanému roztoku.

Látka používaná jako vnitřní standard by měla mít podobné chemické a analytické vlastnosti jako analyty. Testovány byly kyselina salicylová, acetylsalicylová, benzoová a 1-naftyloctová (obrázek 8).

Obrázek 8. Testování látek vhodných pro použití jako vnitřní standard



Všechny z testovaných látek vykázaly vhodné elektroforetické chování při analýze v borátovém pufru, modifikovaném přídatkem 15 % methanolu (v/v) a 20 mmol.l⁻¹ SDS. Kyselina benzoová byla vyřazena, protože se vyskytuje v některých druzích drobného ovoce a její retenční čas je prakticky totožný s retenčním časem kvercetin. Ze stejných důvodů se nehodila ani kyselina salicylová. Kyselina acetylsalicylová, ačkoliv její retenční čas vyhovuje, má podstatně nižší absorpci při vlnové délce 270 nm. Jako vhodný vnitřní standard byla vybrána kyselina 1-naftyloctová. Tato látka se hodí jako vnitřní standard také při analýze rutinu.

Analytická odezva je při použití vnitřního standardu počítána jako poměr plochy píku kvercetin nebo rutinu a plochy píku vnitřního standardu. RSD ploch píků kvercetin počítaná ze souboru 11 nezávislých měření činí 36 % a u rutinu 41 %. RSD relativních analytických odezev, počítaná ze souboru 11 nezávislých měření, činí pro

kvercetin 2,6 % a pro rutin 2,4 %. Použití vnitřního standardu vede tedy k výraznému zlepšení reprodukovatelnosti analytického měření.

6.1.2. Hydrolýza

Kvercetin vytváří ve flavonoidních glykosidech necukernou část molekuly, tzv. aglykon. Ke stanovení celkového obsahu kvercetinu je potřeba provést hydrolýzu veškerých přítomných flavonoidních glykosidů. Hydrolýza bývá nejčastěji prováděna pomocí kyseliny chlorovodíkové (Hertog et al., 1992a, Häkkinen et al., 1998, Karakaya a El Nehir, 1999, Tsanova-Savova a Rybarova, 2002).

V hydrolytickém kroku vychází metoda stanovení celkového obsahu kvercetinu z práce Hertoga et al., (1992a). Lyofilizovaný materiál je podroben kyselé hydrolýze v prostředí 50 % methanolu. Hydrolýzu zajišťuje přídavek HCl v konečné koncentraci 1,2 mol.l⁻¹. Podle téže práce (Hertog et al., 1992a) je hydrolýza trvající 2 hodiny dostatečná pro kompletní hydrolýzu veškerých glykosidů kvercetinu.

Pro hydrolýzu vzorku pro stanovení celkového obsahu kvercetinu v lyofilizovaném rostlinném materiálu byl používán následující postup.

Navážka zhruba 0,5 g lyofilizovaného zhomogenizovaného materiálu, váženého na analytických vahách s přesností na 0,1 mg, byla vložena do 100 ml varné baňky s 12,5 ml methanolu, 7,5 ml vody a 5 ml 6 mmol.l⁻¹ HCl. Konečná koncentrace HCl ve směsi byla 1,2 mol.l⁻¹. Tato směs byla hydrolyzována 2 hodiny pod zpětným chladičem v termostatované vodní lázni při teplotě 90 °C. Poté byla směs ochlazená pod chladičem na laboratorní teplotu a dále zpracovávána. Získaný hydrolyzát je velmi kyselý a před dalšími postupy je neutralizován přídavkem vypočteného množství NaHCO₃ (2g) přímo do varné baňky.

Hydrolýza vzorků nápojů, např. vína, byla prováděna metodou popsanou v literatuře (Hertog et al., 1993b) účinkem HCl v prostředí 50 % methanolu. Pipetované množství 2,5 ml nápoje bylo smícháno s 12,5 ml methanolu, 5 ml vody a 5 ml 6 mol.l⁻¹ HCl v 100 ml varné baňce. Směs byla hydrolyzována 2 hodiny pod zpětným chladičem v termostatované vodní lázni při teplotě 90 °C. Po ochlazení byla provedena neutralizace neutralizován přídavkem vypočteného množství NaHCO₃ (2g) přímo do varné baňky.

6.1.2.1. Použití antioxidantu

V původní práci (Hertog et al., 1992a) a v pracích navazujících autoři Häkkinen et al. (1998), Karakaya a El Nehir, (1999), používají přídavek t-buthydrochinonu (TBHC) jako antioxidant k zamezení ztrát kvercetinu při hydrolytickém kroku. Tato látka byla testována také ve vyvíjené metodě. Bylo zjištěno, že TBHC nevyhovuje, protože při analýze vzorku kapilární elektroforézou pík TBHC koliduje s píkem kvercetinu a zcela znemožňuje jeho odečet. Podle literatury (Häkkinen et al., 1998) byl vyzkoušen jako antioxidant přídavek kyseliny askorbové v množství 80 mg na navážku 0,5 g lyofilizovaného vzorku. Kyselina askorbová se přidává do směsi před hydrolyzou. Tato látka vzhledem ke své výborné rozpustnosti ve vodě nečiní žádné problémy v izolačním ani v analytickém kroku.

6.1.3. Vývoj a optimalizace extrakčního procesu

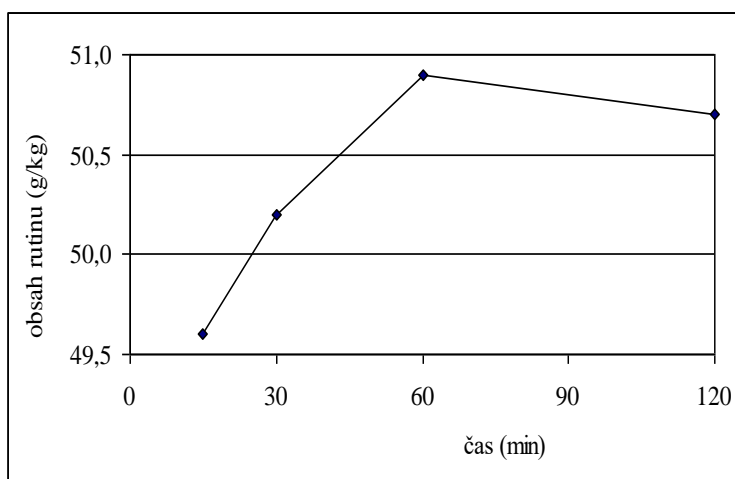
Metodika extrakce byla vyvíjena pro analýzu glykosidu rutinu, který je majoritním flavonoidem ve všech částech rostliny pohanky. Pro stanovení obsahu rutinu je třeba uvolnit analyt z rostlinného pletiva a vhodně ho z extraktu izolovat.

Pohanka setá poskytuje čtyři odlišné části – květy, listy, stonky a plody. Při optimalizaci extrakce byl postup testován na všech čtyřech typech materiálu. Jako extrakční činidlo byl zvolen 50 % methanol a stejně jako při stanovení kvercetinu byla používána kyselina askorbová jako antioxidant v množství 80 mg na vzorek. Navážka zhruba 0,5 g lyofilizovaného zhomogenizovaného materiálu, váženého na analytických vahách s přesností na 0,1 mg, byla vložena do 100 ml varné baňky s 80 mg kyseliny askorbové, 12,5 ml methanolu a 12,5 ml vody. Tato směs byla extrahována pod zpětným chladičem v termostatované vodní lázni při teplotě 90 °C. Poté byla směs ochlazená na laboratorní teplotu a dále zpracovávána.

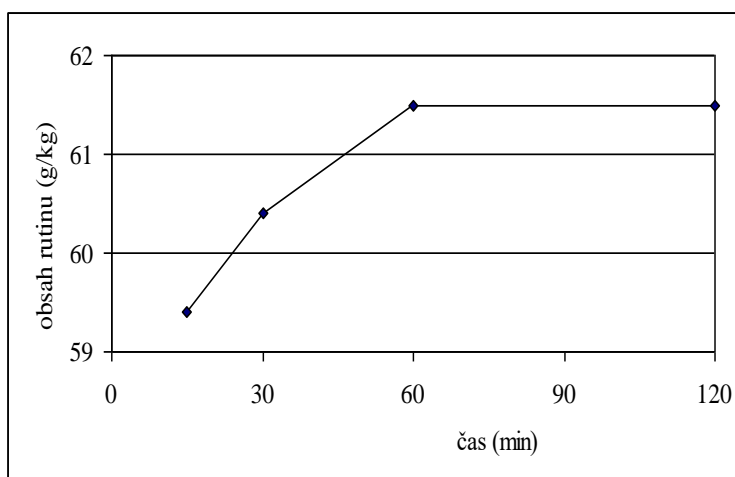
6.1.3.1. Optimalizace délky doby extrakce

Délka extrakce byla testována pro všechny čtyři rostlinné části pohanky odděleně. Pro ověření byla vybrána odrůda Aelita, získaná na pokusných pozemcích ZF JU. Byla posuzována extrakce trvající 15, 30, 60 a 120 minut.

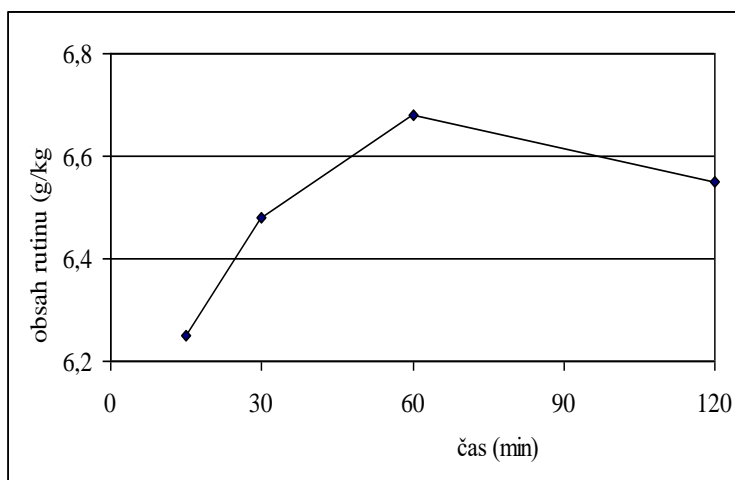
Obrázek 9. Závislost koncentrace rutinu v listu pohanky seté na délce doby extrakce



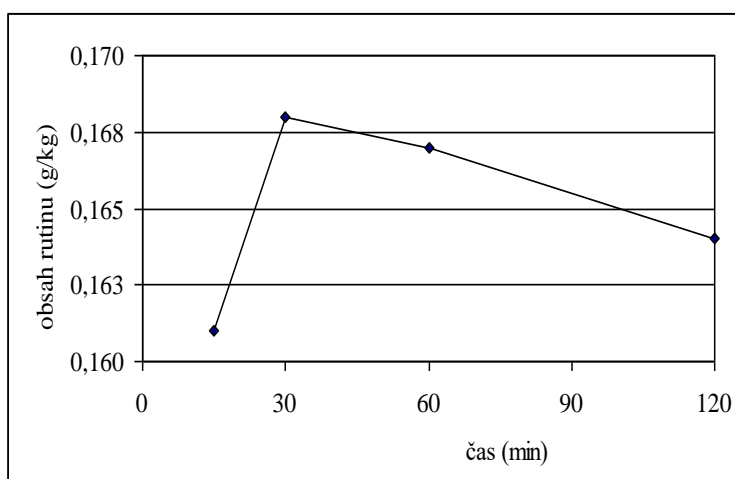
Obrázek 10. Závislost koncentrace rutinu v květu pohanky seté na délce doby extrakce



Obrázek 11. Závislost koncentrace rutinu ve stonku pohanky seté na délce doby extrakce



Obrázek 12. Závislost koncentrace rutinu v nažkách pohanky seté na délce doby extrakce



Maximální koncentrace rutinu byla u všech typů materiálu nalezena při extrakci trvající 60 minut, po delší době docházelo k velmi mírnému poklesu koncentrace (obrázky 9, 10, 11 a 12). Pro extrakci rutinu z rostlinných lyofilizovaných vzorků byla proto za optimální považována doba 60 minut.

6.1.4. Zakoncentrování a přečištění

Vzorek po ukončení hydrolyzy či extrakce obsahoval zbytky rostlinného materiálu a množství balastních látek a vodivých iontů, které znemožňují přímou

analýzu na kapilární elektroforéze. Proto bylo nutno vzorek před analýzou přečistit, zakoncentrovat a převést do méně vodivého prostředí. Při vývoji přečištění vzorku se postupovalo tak, aby tato technika byla použitelná při stanovení obou sledovaných látek, kvercetin a rutinu.

Nápoje a šťávy odstředování nevyžadují, neboť podíl mechanických částic v nich je velmi nízký.

Při optimalizaci byla testována možnost filtrace zbytků vzorku, extrakce analytů nemísitelnou kapalinou a postup skládající se z odstředění zbytků vzorku a extrakce analytů metodou SPE.

6.1.4.1. Filtrace zbytků vzorku

Při další úpravě hydrolyzátu bylo zjištěno, že se nedá bez úpravy zfiltrovat ani přes filtrační papír, ani přes filtr ze skleněných vláken za sníženého tlaku. Z literatury je však známo, že filtrovatelnost biologických vzorků se dá zlepšit použitím srážedel (Davídek, 1981). Z běžně používaných srážedel bylo otestováno použití kyseliny fosfowolframové a Carrezova činidla. Gel vzniklý při použití Carrezova činidla však není filtrovatelný ani za sníženého tlaku přes filtr ze skleněných vláken. Při použití kyseliny fosfowolframové bylo možno zbytky vzorku odfiltrovat za sníženého tlaku přes filtr ze skleněných vláken. Použití kyseliny fosfowolframové však snižuje výtěžnost kvercetin přibližně o 20 % (Dadáková et al., 2001) a proto tento postup nebyl dále používán.

6.1.4.2. Extrakce nemísitelnou kapalinou.

Extrakce nemísitelnou kapalinou byla používána zejména při analýze flavonoidů ve vzorcích nápojů (Rodriguez-Delgado et al., 2000, Garcia-Viguera a Bridle, 1995) a jako extrakční kapalina byl používán diethylether.

Postup extrakce nemísitelnou kapalinou byl testován na hydrolyzátu červeného vína. K 25 ml hydrolyzátu v 50 ml zábrusové zkumavce bylo přidáno 10 ml diethyletheru a směs byla 5 minut extrahována převrácením. Za těchto podmínek však diethylether vytvářel s hydrolyzovaným vzorkem homogenní směs, která se velmi špatně rozdělovala a proto bylo od tohoto postupu upuštěno.

6.1.4.3. Odstředování

Další testovanou možností odstranění zbytků vzorku z roztoku je odstředění. Postup byl ověřen jak pro stanovení kvercetinu, tak pro stanovení rutinu. Jako modelové vzorky byly použity jednak hydrolyzát kontrolního vzorku plodů pohanky, dále pak extrakt vzorku plodů pohanky odrůdy Aelita. Tento metodický krok byl optimalizován společně s další etapou – vývojem postupu SPE (kapitola 6.1.4.5.).

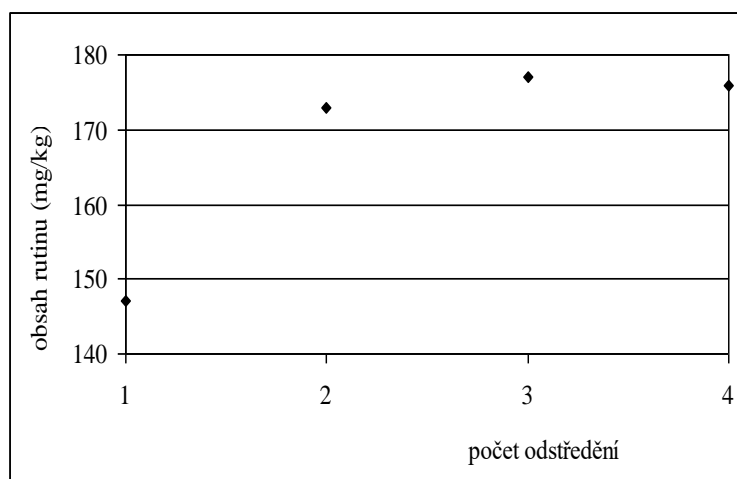
Modelové vzorky byly odstředěny (15 minut, 3500 otáček za minutu) a supernatant byl opatrně odebrán a převeden do odměrné baňky o objemu 250 ml.

Vzhledem k možným ztrátám analytů ve zbytcích vzorků bylo dále ověřeno opakované promytí sedimentu s následným odstředěním za stejných podmínek.

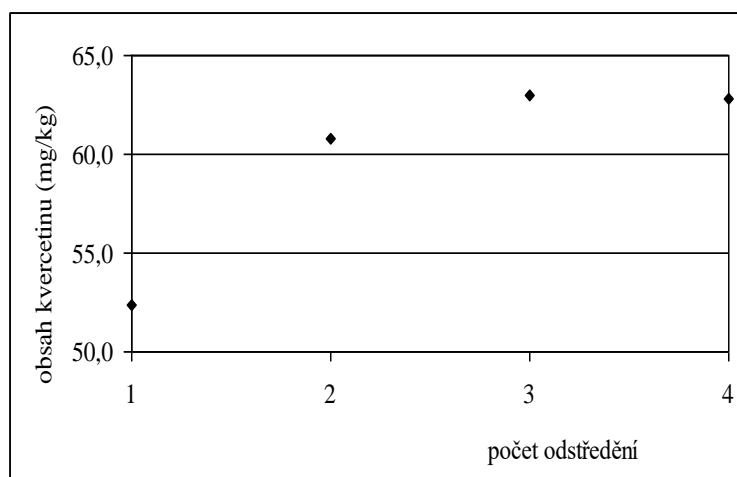
Sediment byl po prvním odstředění resuspendován v 12,5 ml methanolu a 25 ml vody a poté byl znovu odstředěn. Supernatanty z prvního a druhého odstředování byly spojeny. Celkový obsah methanolu je v tomto případě 25 ml a výsledný roztok je třeba naředit na objem 500 ml, aby byla zachována výsledná koncentrace methanolu 5 %. Třetí a čtvrté odstředění bylo pak opakováno pokaždé s použitím 37,5 ml vody. Methanol nebyl již do extrakčního činidla přidáván, aby jeho obsah ve spojených supernatantech, doplněných do 500 ml, nepřesáhl obsah 5 %.

S oběma modelovými vzorky byly provedeny čtyři pokusy lišící se počtem odstředování. Upravené supernatanty ze všech experimentů byly filtrovány (kapitola 6.1.4.4.), zakoncentrovány metodou SPE (kapitola 6.1.4.5.) a analyzovány na kapilární elektroforéze. Získané výsledky byly vyneseny do grafů (obrázky 13 a 14).

Obrázek 13. Obsah rutinu v plodech pohanky Aelity při různém počtu odstředění



Obrázek 14. Obsah kvercetinu v kontrolním vzorku plodů pohanky při různém počtu odstředování



Z měření vyplynulo, že třikrát opakované odstředění je dostatečné a další opakování nepřináší významné zlepšení výtěžnosti tohoto kroku.

6.1.4.4. Filtrace

Spojené supernatanty získané při odstředování obsahují ještě rozptýlené jemné částice vzorku. Ty je nutno odstranit filtrací, protože jinak docházelo k ucpávání SPE kolon. Bylo též nutno ověřit, zda nedochází k ztrátě analytů sorpcí na materiál filtru.

K testování byly použity čtyři modelové roztoky o objemu 500 ml, obsahující 5 a 100 µg kvercetin, respektive 5 a 2000 µg rutinu (5% (v/v) methanolu, 80 mg kyseliny askorbové, pH = 3,5). Jako filtrační materiály byly použity filtry ze skleněných vláken GF/C (Whatman, Velká Británie) a filtrační papír Filtrak 389 (Filtrak GmbH, Německo). Filtrace byla realizována na skleněném vakuovém filtračním zařízení (Sigma). Filtrát byl sorbován na kolonkách RP-18 (Merck) a analyzován kapilární elektroforézou. Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce (tabulka 4).

Tabulka 4 Výtěžnost rutinu a kvercetin při filtraci

		Skleněné vlákno GF/C	Filtrační papír Filtrak 389
kvercetin	5 µg	99,9	53
	100 µg	100	54,5
rutin	5 µg	100	87
	2000 µg	99,8	81

Jako filtrační materiál byl pro oba analyty zvolen filtr ze skleněných vláken, kde úbytek analytů nebyl pozorován.

6.1.4.5. Optimalizace metody SPE

Jako metoda pro zakoncentrování analytů byla testována extrakce na tuhé fázi (SPE). Při SPE je vzorek prosáván přes kolonku, obsahující sorbent zakotvený na pevném nosiči, kterým bývá zpravidla SiO₂. Sledovaný analyt se zachytí na sorbentu, ze kterého je následně eluován vhodným rozpouštědlem. Kolonky se liší typem a množstvím sorbentu. Pro studium sorpce kvercetin a rutinu byly používány modelové roztoky, obsahující různé koncentrace standardu rutinu a kvercetin. Tato metoda byla určena pro izolaci a zakoncentrování analytů z hydrolyzátu či extraktu, získaném v předchozím kroku (kapitola 6.1.2.).

V této části práce byl vybrán nejvhodnější typ SPE kolonky a byla optimalizována úprava extrakční (respektive hydrolytické) směsi z hlediska nejvyšší výtěžnosti sledovaných analytů.

Všechny typy kolonek byly před aplikací vzorku připraveny kondicionací prosátím 10 ml methanolu a 10 ml vody. Vzorky pak byly kolonkou prosávány za použití vakua rychlostí 500 ml za 30 minut. Kolonky byly poté 15 minut sušeny procházejícím vzduchem podle doporučení výrobce. Zachycené látky byly eluovány 1,4 ml methanolu do měrné vialky. K roztoku ve vialce bylo přidáno 100 µl roztoku vnitřního standardu kyseliny 1-naftyloctové v koncentraci 2 mg/ml v methanolu. Eluát byl analyzován na kapilární elektroforéze.

6.1.4.5.1. Volba typu SPE kolonek

Byly testovány kolonky firmy MERCK typů LiChrolut RP-18 (500 mg), LiChrolut RP-18E (500 mg), LiChrolut NH₂ (500 mg), LiChrolut CN (500 mg) a LiChrolut Si (200 mg). Testovací roztoky obsahovaly kvercetin v množství 5, 10, 30, 50, 70 a 100 µg, respektive rutin v množství 5, 10, 50, 100, 500, 1000 a 2000 µg.

Vzorky měly objem 500 µl, obsah methanolu 5 % (v/v) a pH bylo upraveno 1 mol.l⁻¹ HCl na hodnotu 3,5. Získané výsledky byly přepočteny na výtěžnost vzhledem k původnímu obsahu obou analytů. Výsledné hodnoty výtěžností se pro všechny testované obsahy příliš nelišily a proto byly zprůměrnovány (tabulka 5).

Tabulka 5 Výtěžnost kvercetinu a rutinu na různých typech SPE kolonek.

typ kolonek	Výtěžnost (%)	
	kvercetin	rutin
NH ₂	0	0
CN	3	2
SI	0	0
RP-18 E	33	11
RP-18	99	100

Na kolonkách s chemicky modifikovanou oktadecylovou fází (NH₂, CN), stejně jako na kolonce s čistým silikagelem (Si) byla výtěžnost prakticky nulová. Naproti tomu na nepolární zakotvené fázi C₁₈ (kolonka RP-18) se výtěžnost blížila 100 %.

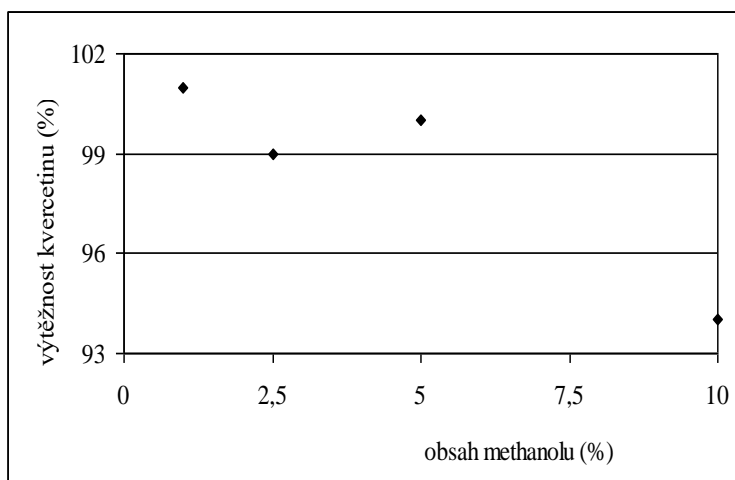
Pro další optimalizaci byly proto vybrány kolonky RP-18.

6.1.4.5.2. Obsah methanolu

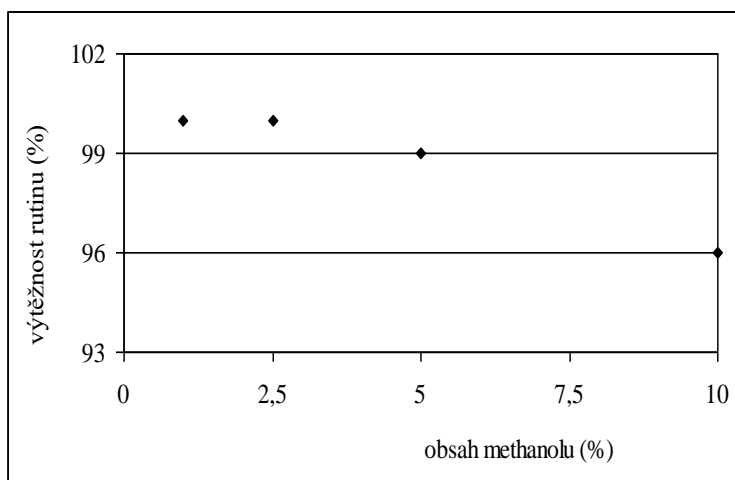
Podle použitého postupu vycházejícího z práce Hertoga et al. (1992a) jsou vzorky rostlinného materiálu hydrolyzovány či extrahovány v roztoku obsahujícím 50 % methanolu. Pro přímé použití roztoku pro metodu SPE je tato koncentrace methanolu příliš vysoká. Cílem optimalizace bylo zjistit, jaká maximální koncentrace methanolu ještě neovlivní sorpci na vybrané koloně RP-18.

Pro testování byly použity modelové roztoky obsahující kvercetin (5 a 100 µg) a rutin (5 a 2000 µg). Obsah methanolu činil 1, 2,5, 5 a 10 % (v/v). Testovací roztoky byly prosáty přes kolonky, zachycené analyty eluovány a eluáty měřeny na kapilární elektroforéze. Výsledky byly vyjádřeny jako procentuální výtěžnost vneseného obsahu analytu. Pro grafické vyjádření byl použit průměr výtěžností pro oba testované obsahy (obrázky 15 a 16).

Obrázek 15. Výtěžnost kvercetinu na kolonkách RP-18 (Merck) při různém obsahu methanolu v roztoku.



Obrázek 16. Výtěžnost rutinu na kolonkách RP-18 (Merck) při různém obsahu methanolu v roztoku.



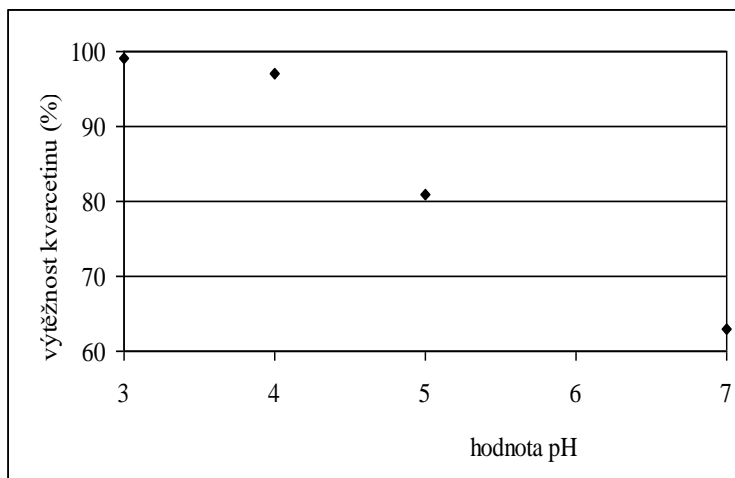
Bylo zjištěno, že výtěžnost začne významně klesat až při obsahu methanolu větším než 5 % (v/v). Roztok získaný úpravou hydrolyzátu či extraktu vzorku, určený pro zakoncentrování metodou SPE, musí být proto zředěn na obsah 5 % methanolu. Ředění na nižší koncentraci methanolu by vedlo k prodloužení postupu a nepřineslo by výrazné zlepšení výtěžnosti.

6.1.4.5.3. Hodnota pH

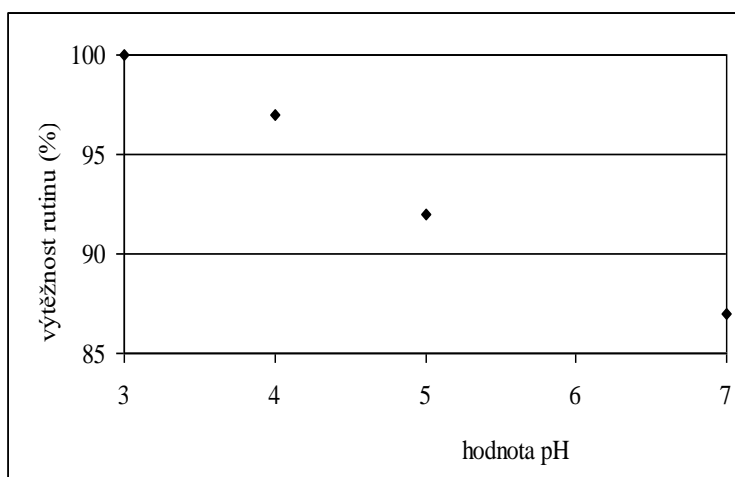
Oba analyty jsou fenolické látky, jejichž rozpustnost ve vodě je závislá na pH. V rámci optimalizace SPE metody byl proto testován vliv hodnoty pH roztoku na výtěžnost SPE sorpce.

Pro optimalizaci byly použity kolonky RP-18 (Merck) a modelové roztoky (500 ml) obsahující kvercetin (5 a 100 μg) a rutin (5 a 2000 μg). Obsah methanolu v těchto roztocích byl 5 % (v/v). Kyselost roztoků byla nastavována pomocí 1 mol.l^{-1} NaOH a 1 mol.l^{-1} HCl na hodnoty pH 3, 4, 5 a 7. Nižší hodnoty pH nedoporučuje výrobce kolonek. Naměřené výsledky byly vyjádřeny jako procentuální výtěžnost vneseného obsahu analytu, zprůměrovány pro oba obsahy a vyneseny do grafů (obrázky 17 a 18).

Obrázek 17. Výtěžnost kvercetinů na kolonkách RP-18 (Merck) při různém pH roztoku.



Obrázek 18. Výtěžnost rutinu na kolonkách RP-18 (Merck) při různém pH roztoku.



Z grafu je zřejmé, že výtěžnost sorpce na SPE klesá se zvyšujícím se pH. Optimální hodnota pH pro sorpci obou analytů je 3.

6.1.4.5.4. Testování kolonek Strata-X (Phenomenex Inc., USA)

Pro sorpci kvercetinů byly testovány jako alternativní materiál kolonky Strata-X (60 mg, Phenomenex, USA). Sorbent v tomto typu kolonek je povrchově modifikovaný styren-divinylbenzenový polymer. Výrobce uvádí výborné výtěžnosti pro fenoly a vysokou sorpční kapacitu.

Kolonky byly testovány modelovým roztokem obsahujícím kvercetin v množství 5 a 100 µg (500 ml, obsah methanolu 5 % (v/v), pH 3,5). Dále byly kolonky použity pro stanovení celkového obsahu kvercetinu kontrolním vzorku (mleté plody pohanky seté). Roztoky byly prosátý přes testovací kolonky, eluovány methanolem a změřeny na kapilární elektroforéze.

Tabulka 6 Výtěžnost kvercetinu na kolonkách Strata-X

Vzorek	Obsah kvercetinu	Stanoveno	Výtěžek na kolonce
modelový roztok	(µg)	(µg)	(%)
	5	4,85	97
	100	96,3	96,3
pohanka plody (průměr ze šesti měření)	(mg/kg)	(mg/kg)	(%)
	72,2	78,2	108
		69,9	96,8
		77,4	107
		70,0	96,9
		61,6	94,7

Z výsledků je zřejmé (tabulka 6), že výsledky dosažené pomocí kolon Strata-X plně odpovídají výsledkům dosaženým za využití kolon RP-18 (Merck) a kolonky Strata-X mohou být používány při analýze celkového kvercetinu v rostlinném materiálu.

6.1.5. Optimalizované pracovní postupy

Z výše popsaných experimentů vyplynuly konečné podoby pracovních postupů pro analýzu kvercetinu a rutinu.

6.1.5.1. Stanovení obsahu celkového kvercetinu

Navážka zhruba 0,5 g lyofilizovaného zhomogenizovaného materiálu, váženého na analytických vahách s přesností na 0,1 mg, byla vložena do 100 ml varné baňky s

12,5 ml methanolu, 7,5 ml vody, 80 mg kyseliny askorbové a 5 ml 6 mol.l^{-1} HCl. Tato směs byla hydrolyzována 2 hodiny pod zpětným chladičem v termostatované vodní lázni při teplotě $90 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Hydrolyzovaný vzorek byl po vychlazení neutralizován 2 g NaHCO_3 , převeden do odstředivací kyvety a odstředěn (15 minut, 3500 otáček za minutu). Sediment byl resuspendován pomocí 12,5 ml methanolu a 25 ml vody a odstředěn za stejných podmínek. Postup byl opakován ještě jednou s použitím 37,5 ml vody. Spojené supernatanty byly shromažďovány v 600 ml kádince, doplněny do 200 ml vodou a kyselost roztoku byla upravena na hodnotu $\text{pH} = 3$ nasyceným roztokem NaHCO_3 . Roztok byl přefiltrován za sníženého tlaku přes filtr ze skleněných vláken GF/C (Whatman, Velká Británie) a filtrát byl poté kvantitativně převeden do 500 ml odměrné baňky a doplněn vodou po rysku. Tento roztok byl použit pro SPE na kolonkách. Zachycené látky byly eluovány pomocí 1,4 ml methanolu do měrné vialky. Do vialky byl přidán roztok vnitřního standardu kyseliny 1-naftyloctové v methanolu (objem 0,1 ml, koncentrace 2 mg/ml v methanolu).

Připravený roztok byl měřen na kapilární elektroforéze s použitím borátového pracovního pufru o složení 10 mmol.l^{-1} tetraboritanu sodného, 10 mmol.l^{-1} kyseliny borité, 20 mmol.l^{-1} SDS a 15 % (v/v) methanolu, $\text{pH} 9,2$. Pracovní napětí přístroje bylo 20 kV a pracovní teplota $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.1.5.2. Stanovení obsahu celkového kvercetinu v nápojích

Objem 2,5 ml nápoje byl pipetován do 100 ml varné baňky s 12,5 ml methanolu, 5 ml vody, 80 mg kyseliny askorbové a 5 ml 6 mol.l^{-1} HCl. Tato směs byla hydrolyzována 2 hodiny pod zpětným chladičem v termostatované vodní lázni při teplotě $90 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Hydrolyzovaný vzorek byl po vychlazení neutralizován 2 g NaHCO_3 a převeden do 600 ml kádinky. Varná baňka byla vypláchnuta 12,5 ml methanolu a vodou k zamezení ztrát analytu. Roztoky v kádince byly doplněny do 200 ml vodou a kyselost roztoku byla upravena na hodnotu $\text{pH} = 3$ nasyceným roztokem NaHCO_3 . Roztok byl kvantitativně převeden do 500 ml odměrné baňky a doplněn po rysku. Tento roztok byl použit pro SPE na kolonkách. Zachycené látky byly eluovány 1,4 ml methanolu do měrné vialky. Do vialky byl přidán roztok vnitřního standardu kyseliny 1-naftyloctové v methanolu (objem 0,1 ml, koncentrace 2 mg/ml v methanolu).

Připravený roztok byl měřen na kapilární elektroforéze s použitím borátového pracovního pufru o složení 10 mmol.l⁻¹ tetraboritanu sodného, 10 mmol.l⁻¹ kyseliny borité, 20 mmol.l⁻¹ SDS a 15 % (v/v) methanolu, pH 9,2. Pracovní napětí přístroje bylo 20 kV a pracovní teplota 25 °C.

6.1.5.3. Stanovení rutinu

Navážka zhruba 0,5 g lyofilizovaného zhomogenizovaného materiálu, váženého na analytických vahách s přesností na 0,1 mg, byla vložena do 100 ml varné baňky s 12,5 ml methanolu, 12,5 ml vody a 80 mg kyseliny askorbové. Tato směs byla extrahována 1 hodinu pod zpětným chladičem v termostatované vodní lázni při teplotě 90 °C. Extrahovaný vzorek byl po vychlazení převeden do odstředivací kyvety a odstředěn (15 minut, 3500 otáček za minutu). Sediment byl resuspendován pomocí 12,5 ml methanolu a 25 ml vody a odstředěn za stejných podmínek. Postup byl opakován ještě jednou s použitím 37,5 ml vody. Spojené supernatanty byly shromažďovány v 600 ml kádince, doplněny do 200 ml vodou a kyselost roztoku byla upravena na hodnotu pH = 3 pomocí roztoku HCl o koncentraci 1 mol.l⁻¹. Roztok byl přefiltrován za sníženého tlaku přes filtr ze skleněných vláken GF/C (Whatman, Velká Británie) a filtrát byl poté kvantitativně převeden do 500 ml odměrné baňky a doplněn vodou po rysku. Tento roztok byl použit pro SPE na kolonkách. Zachycené látky byly eluovány pomocí 1,4 ml methanolu do měrné vialky. Do vialky byl přidán roztok vnitřního standardu kyseliny 1-naftyloctové v methanolu (objem 0,1 ml, koncentrace 2 mg/ml v methanolu).

Připravený roztok byl měřen na kapilární elektroforéze s použitím borátového pracovního pufru o složení 10 mM tetraboritanu sodného, 10 mM kyseliny borité, 20 mM SDS a 15 % (v/v) methanolu, pH 9,2. Pracovní napětí přístroje byl 20 kV a pracovní teplota 25 °C.

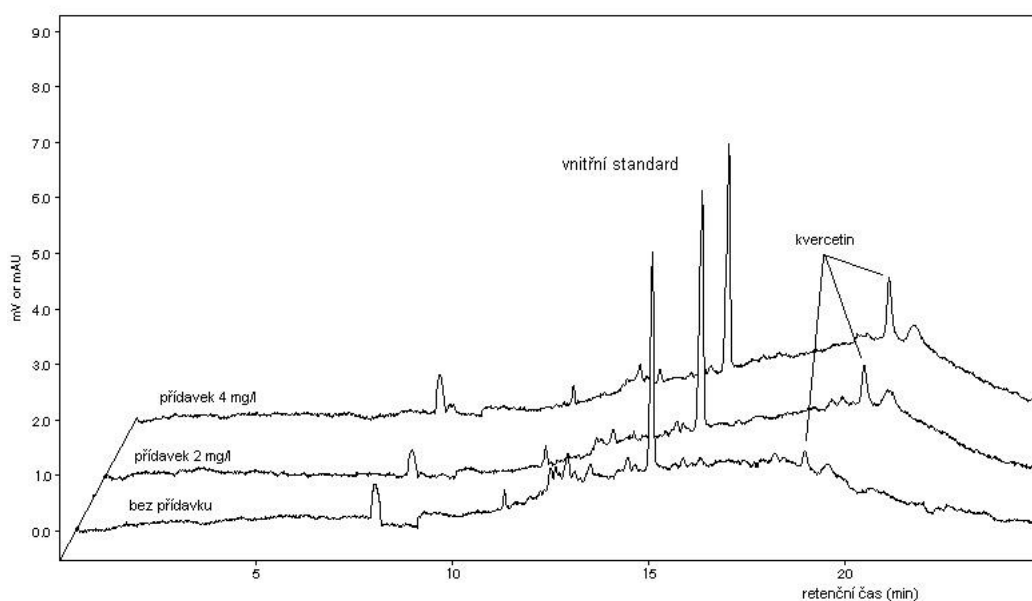
6.1.6. Způsob vyhodnocení

Výsledkem dělení extraktu vzorku byl záznam, který představoval závislost absorbance analytů na čase, tzv. elektroforegram. Plocha píků byla vypočtena pomocí programového vybavení pro obsluhu přístroje. Jako analytická odezva byl brán poměr plochy píku stanovované látky ku ploše píku vnitřního standardu. Tento postup byl

zvolen z důvodu korekce nižší reprodukovatelnosti objemu nástřiku. Stanovované látky byly identifikovány pomocí relativních retenčních časů (podíl retenčního času sledované látky a retenčního času vnitřního standardu) srovnáním s kalibračními standardy. K bezpečnému potvrzení identity píku posloužila také metoda standardního přídávku.

Kalibrace byla prováděna proměřením řady kalibračních roztoků, obsahujících kvercetin v množství 5 až 100 μg nebo rutin v množství 5 až 2000 μg . Všechny kalibrační roztoky obsahovaly vnitřní standard v množství 200 μg . Závislost analytické odezvy na obsahu analytu ve vialce byla proložena přímkou metodou nejmenších čtverců. Z rovnice přímky, analytické odezvy získané z měření neznámého vzorku a navážky vzorku byl vypočítán obsah analytu ve vzorku. Konečný výsledek byl získán metodou standardního přídávku. Velikost přídávku byla zvolena přibližně ve výši 100 a 200% prvního měření obsahu analytu ve vzorku. Analyt se přidával ke vzorku na začátku zpracování ve formě methanolickeho roztoku. Standardní přídavek umožnil zahrnout do konečného výsledku výtěžnost celého postupu. Standardní přídavek umožnil také bezpečně identifikovat analyt. Příklad záznamů analýz vzorku červeného vína bez přídávku a s oběma standardními přídávky je na následujícím obrázku (obrázek 19).

Obrázek 19. Záznamy analýzy červeného vína se standardním přídávkem kvercetinu



Z obrázku je zřejmé, že metoda standardního přídavku významně usnadní identifikaci píku kvercetinu.

6.1.7. Stanovení základních statistických parametrů metody

Mezi základní statistické parametry metody patří linearita pracovního rozsahu, mez detekce, mez stanovitelnosti a rozšířená nejistota měření.

Pro odhad meze detekce a stanovitelnosti celkového kvercetinu v rostlinném materiálu byl použit vzorek červeného vína Frankovka. Tento materiál představuje dostatečně komplexní matici a obsahuje i většinu rušivých vlivů, se kterými je možno se setkat při stanovení kvercetinu. Přirozený obsah kvercetinu je velmi malý a vzorek je homogenní. Metoda použitá pro stanovení obsahu kvercetinu ve víně je zkrácená, bez odstředění a filtrace. Mez detekce byla odhadnuta jako trojnásobek směrodatné odchylky deseti paralelních měření obsahu celkového kvercetinu ve vzorku vína a činí 0,43 mg/l. Mez stanovitelnosti byla odhadnuta jako desetinásobek směrodatné odchylky deseti paralelních měření obsahu celkového kvercetinu ve vzorku vína. Získaný výsledek 1,44 mg/l byl zaokrouhlen na 2 mg/l.

Naměřené hodnoty byly zobecněny také pro odhad meze detekce a stanovitelnosti celkového kvercetinu v lyofilizovaném rostlinném materiálu s obvyklou navázkou 0,5 g. Mez detekce činila 4 mg/kg a pro mez stanovitelnosti byla vypočtená hodnota 7,22 mg/kg lyofilizované sušiny zaokrouhlena na 10 mg/kg.

Zobecnění mohlo být použito, protože oba typy vzorků jsou zpracovávány metodou se stejným principem. Matrice červeného vína poskytuje stejnou nebo i větší úroveň šumu ve srovnání s obvyklými maticemi lyofilizovaného rostlinného materiálu. Odhadnutá rozšířená nejistota je pro obě metody totožná (15 %). Hlavní příspěvky celkové nejistoty tvoří příspěvek nejistoty hydrolyzy a příspěvek nejistoty analytické koncovky.

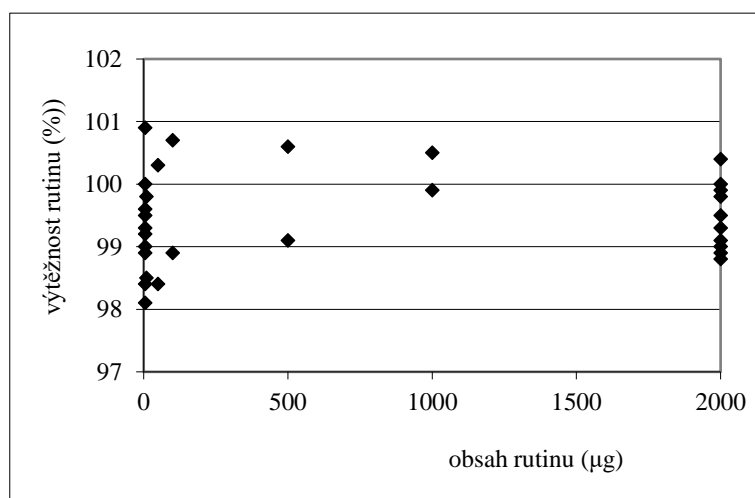
Pro odhad meze stanovitelnosti rutinu byl použit materiál lyofilizovaného květáku bez obsahu vlastního rutinu obohacený standardem rutinu v množství 10 mg/kg. Vzorky byly zpracovány metodou vyvinutou pro stanovení obsahu rutinu. Mez detekce byla odhadnuta jako trojnásobek směrodatné odchylky deseti paralelních měření a činí 2,31 mg/kg. Mez stanovitelnosti byla odhadnuta jako desetinásobek

směrodatné odchylky deseti paralelních měření téhož materiálu. Získaný výsledek 7,7 mg/kg byl zaokrouhlen na 10 mg/kg.

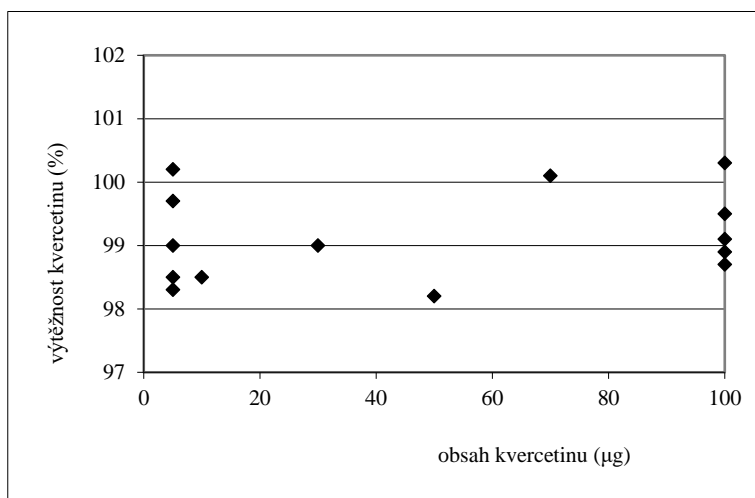
Horní mez pracovního rozsahu je dána jednak lineárním rozsahem detektoru a také sorpčními vlastnostmi používaných SPE kolonek. Linearita detektoru byla ověřena přímo měřeními modelovými roztoky, obsahujícími kvercetin v množství 5 až 100 μg , resp. rutin v množství 5 až 2000 μg . Z výpočtu vyplynulo, že odezva detektoru pro oba analyty v uvedených pracovních rozsazích je lineární.

Sorpční vlastnosti používaných kolonek SPE byly ověřeny změřením výtěžnosti v celém pracovním rozsahu. Výtěžnost byla testována modelovými roztoky obsahujícími kvercetin v množství 5 až 100 μg , resp. rutin v množství 5 až 2000 μg . Naměřené výtěžnosti pro různé obsahy kvercetinu a rutinu ve vzorcích byly vyneseny do grafu (obrázky 20 a 21).

Obrázek 20. Výtěžnost rutinu na kolonkách RP-18 (Merck)



Obrázek 21. Výtěžnost kvercetinu na kolonkách RP-18 (Merck)



Z grafů je zřejmé, že v rámci pracovních rozsahů jednotlivých analytů je výtěžnost kolonek konstantní a pohybuje se v rozmezí 98 až 101%.

Metoda pro stanovení celkového kvercetinu může být tedy použita pro materiály s obsahem kvercetinu v rozmezí 10 až 200 mg/kg lyofilizovaného rostlinného materiálu při obvyklé navážce 0,5 g. Metoda pro stanovení rutinu je vhodná pro měření s obsahem analytu v rozmezí 10 až 4000 mg/kg lyofilizovaného materiálu. U materiálů, u nichž je stanovena vyšší koncentrace, musí být snížena navážka nebo provedeno ředění extraktu před provedením SPE.

6.1.7.1. Nejistota měření

Odhad kombinované nejistoty metody byl proveden podle postupu uvedeného v příručce Kvalimetrie (Suchánek, 2001). Pro identifikaci všech zdrojů nejistoty byl sestaven diagram příčin a následků (Ishikavův diagram). V jednotlivých krocích byly kvantifikovány příspěvky dílčích nejistot a z nich byla vyčíslena kombinovaná nejistota. Rozšířená nejistota je vypočtena z kombinované nejistoty vynásobením koeficientem rozšíření (zde zvolen koeficient 2).

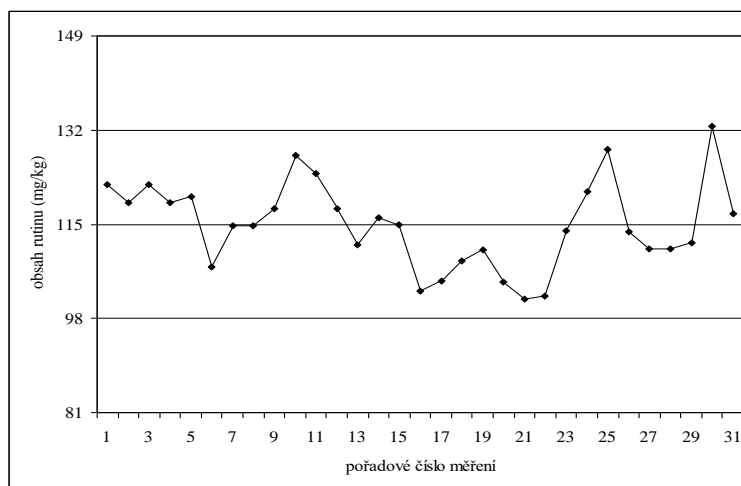
Hodnota rozšířené nejistoty pro stanovení celkového obsahu kvercetinu v lyofilizovaném rostlinném materiálu byla vypočtena na 12,8 % a zaokrouhlena na 15 %. Pro stanovení celkového obsahu kvercetinu v nápojích byla hodnota rozšířené nejistoty vypočtena na 12,9 % a zaokrouhlena na 15 %. Pro stanovení obsahu rutinu

v lyofilizovaném rostlinném materiálu byla hodnota rozšířené nejistoty vypočtena na 11,4 % a zaokrouhlena na 15 %. Z rozborů dílčích nejistot vyplynulo, že největší příspěvky celkové nejistoty tvoří ve všech metodách příspěvek nejistoty hydrolýzy nebo extrakce a příspěvek analytické koncovky.

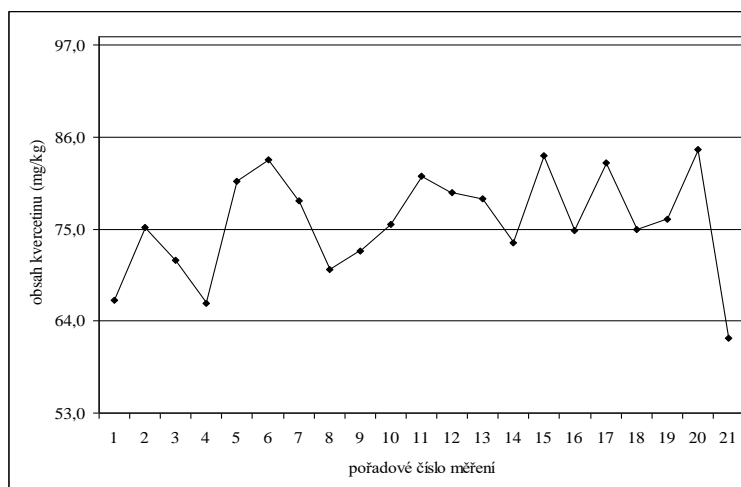
6.1.7.2. Hodnocení dlouhodobé stability analytického systému

Pro hodnocení stability metody stanovení rutinu i kvercetinů byl používán pro tento účel připravený kontrolní materiál. Jednalo se o loupané plody pohanky seté zakoupené v obchodní síti. Materiál byl lyofilizován, rozdrcen na laboratorním mlýnku a skladován za stejných podmínek jako všechny analyzované vzorky. S každou sérií měřených vzorků (zhruba šestkrát do roka) byl celou metodou zpracován i kontrolní vzorek a vyhodnocen podle aktuální kalibrace. Metodou standardních přídavek byla určena skutečná koncentrace analytu. Výsledky byly vynášeny do grafů (obrázky 22 a 23).

Obrázek 22. Dlouhodobý průběh analýz obsahu rutinu v kontrolních vzorcích



Obrázek 23. Dlouhodobý průběh analýz obsahu kvercetinů v kontrolních vzorcích



V obou grafech vyznačené meze představují hranici koncentrací analytu vymezenou rozšířenou nejistotou, která činí u obou analytů 15%. V dlouhodobém průběhu je vidět, že výsledky opakovaných analýz se u obou analytů pohybovaly v rámci odhadnuté velikosti nejistoty. Obě metody tedy poskytují dlouhodobě stabilní a reprodukovatelné výsledky.

6.1.7.3. Mezilaboratorní srovnání

V roce 2001 byla provedena srovnávací analýza kontrolního materiálu (lyofilizované a mleté plody pohanky) v laboratoři katedry chemie ČZU v Praze Suchdole. V materiálu byl stanoven rutin metodou kapalinové chromatografie po extrakci v Soxhletově extraktoru (Lachman et al., 2000). Hodnota obsahu rutinu zjištěná touto metodou byla 75 mg/kg. Z dlouhodobých měření obsahu rutinu v kontrolním vzorku vyvinutou metodou byla získána průměrná hodnota 115 mg/kg. Vzhledem k principiální odlišnosti obou metod lze tyto výsledky považovat za dostatečně shodné.

6.2. Měření obsahu kvercetinů a rutinu v různých rostlinných materiálech

Optimalizované pracovní postupy byly použity pro analýzu kvercetinů a rutinu v připravených vzorcích.

6.2.1. Obsah celkového kvercetinu v souboru ovoce a zeleniny

Soubor 15 druhů zeleniny a 14 druhů ovoce byl pořízen během roku 2001. Představuje běžně konzumované druhy ovoce a zeleniny v České republice.

Informace o celkovém obsahu kvercetinu v ovoci a zelenině jsou poměrně vzácné. Publikované práce se většinou věnují pouze několika vybraným druhům, např. drobné bobulové ovoce (Häkkinen et al., 1999), jablka (Price et al., 1999), cibule (Patil et al., 1995). Dosažené výsledky je možno srovnat pouze s obdobnými soubory dat, které byly získány zahraničních pracovištích v Holandsku (Hertog et al., 1992b) a Dánsku (Justesen et al., 1998). Zatím nebyla publikována práce, která by k analýze celkového obsahu kvercetinu v rozsáhlejší souboru ovoce a zeleniny použila analytickou metodu využívající kapilární elektroforézu.

V literatuře byly obvyklé zdroje flavonoidů rozdělovány podle obsahu sledovaných látek na tři kategorie (Hollman et al., 1996). Materiály podle tohoto dělení mají nízký obsah flavonoidů (méně než 10 mg/kg), střední obsah (do 50 mg/kg) nebo vysoký obsah (více než 50 mg/kg).

Naměřené hodnoty obsahu celkového kvercetinu v souboru ovoce a zeleniny shrnují tabulky 7 a 8. Výsledky jsou srovnány s dříve publikovanými obsahy celkového kvercetinu, měřeními v obdobných souborech ovoce a zeleniny. Z výsledků porovnání je vidět, že použitá metoda využívající kapilární elektroforézu jako analytickou koncovku dosahuje dobré shody s obvykle používanými postupy s koncovkou HPLC.

Tabulka 7 Obsah celkového kvercetinu v zelenině

Materiál	obsah celkového kvercetinu		
	(mg/kg čerstvé hmoty)		
	stanoveno	Hertog (1992)	Justesen (1998)
květák	<0,79	<1	*
zelí bílé	<0,85	<1	*
mrkev	<1,38	*	*
brambory	<1,66	*	*
řepa červená	<2,41	<1	*
česnek	<3,75	*	*
hrášek zelený	<3,76	<4,3	*
zelí červené	6,95	4,1	*
rajče červené	9,62	8	14
fazolky žluté	17,6	17-39	*
fazolky zelené	18,7	*	16
brokolice	36,9	30	37
paprika červená	138	*	*
cibule žlutá	359	347	340
cibule červená	610	*	450

* materiál nebyl analyzován

Hodnota meze stanovitelnosti u kvěťáku, zelí bílého, mrkve, brambor, červené řepy, česneku a zeleného hrášku byla vypočtena pomocí hodnoty sušiny daného vzorku a hodnoty meze stanovitelnosti pro lyofilizovaný materiál, která činí 10 mg/kg.

Z analyzovaných druhů zeleniny mají brokolice a fazolky zelené i žluté střední obsah kvercetinu. Paprika, cibule žlutá a červená představují nejbohatší zdroje kvercetinu v naší stravě vůbec.

Tabulka 8 Obsah celkového kvercetinu v ovoci

Materiál	obsah celkového kvercetinu		
	(mg/kg čerstvé hmoty)		
	stanoveno	Hertog (1992)	Justesen (1998)
angrešt žlutý	<3,66	*	*
třešně	9,68	15	10
jablko letní	11,8	*	*
josta	13,2	*	*
jahody	13,6	8,6	6
jablko podzimní	16,2	21-72	20
rybíz bílý	19,9	*	*
hruška	28,8	3,3-10	*
švestky	35,3	9	15
rybíz černý	35,6	*	37
rybíz červený	37,3	13	8
višně	75,4	*	*
jeřáb červený	108	*	*
bezinky volně rostoucí	307	*	*

* materiál nebyl analyzován

Z analyzovaného ovoce mají střední obsah celkového kvercetinu (do 50 mg/kg materiálu) všechny druhy rybízů, jahody, josta (kříženec angreštu a černého rybízu), švestky, hrušky a jablka. Zejména jablka mohou být významným zdrojem kvercetinu vzhledem k tomu, že jejich spotřeba je z uvedených druhů ovoce největší. U višně a jeřábu červeného (varieta Moravský sladký) byl nalezen vysoký obsah celkového kvercetinu. Jeřáb je však ovoce konzumované spíše zřídka.

Největší obsah celkového kvercetinu byl nalezen u plodů volně rostoucího bezu černého. Toto ovoce, používané pro výrobu šťáv a džemů, slouží spíše jako léčivka.

6.2.2. Kuchyňské úpravy zeleniny

Cibule kuchyňská je oblíbeným druhem zeleniny, často používaným v české kuchyni. Obsah celkového kvercetinu je ve všech odrůdách cibule velmi vysoký a tak se cibule dá považovat za důležitý zdroj kvercetinu v potravě.

6.2.2.1. Obsah celkového kvercetinu ve vybraných odrůdách cibule

Pro analýzu byly vybrány odrůdy Všetana (žlutá), Karmen (červená) a šalotka (bez odrůdy). Všechny druhy byly získány od soukromého pěstitele v roce 2002. Z testovaných odrůd měla největší obsah celkového kvercetinu cibule šalotka (tabulka 9). Obsah celkového kvercetinu ve žluté a červené odrůdě cibule odpovídá publikovaným výsledkům (Hertog et al., (1992b), Justesen et al., (1998), Trichopoulou et al., (2000)). Patil et al., (1995) uvádí koncentrace pohybující se od 117 do 207 mg celkového kvercetinu v kilogramu čerstvého materiálu u všech analyzovaných červených i žlutých odrůd. Podle jeho metodiky byly ale analyzovány prostřední suknice z cibulí. Obsah kvercetinu v cibuli šalotce je v porovnání s ostatními dvěma odrůdami dvojnásobný. Publikované údaje o obsahu celkového kvercetinu v šalotce nebyly nalezeny.

Tabulka 9 Obsah celkového kvercetinu ve vybraných odrůdách cibule

Obsah celkového kvercetinu	sušina	v sušině	v čerstvém
	(%)	(mg/kg suš.)	(mg/kg)
Karmen	13,6	3390	461
Všetana	15,3	3170	485
šalotka	18,4	6100	1120

6.2.2.2. Obsah kvercetinu v jednotlivých suknicích cibule

Ve všech vzorcích získaných z jednotlivých suknic cibule (suchá, první až šestá) byl analyzován obsah celkového kvercetinu a výsledek byl přepočítán na obsah celkového kvercetinu v čerstvém materiálu.

Tabulka 10 Hmotnost a sušiny jednotlivých suknic cibule

Suknice	čerstvá	lyofilizovaná	sušina	část z celk. hmotnosti
	(g)	(g)	(%)	(%)
suchá	12,32	4,94	40,1	5,20
první	41,56	5,85	14,1	17,55
druhá	42,75	5,88	13,8	18,05
třetí	39,62	5,42	13,7	16,73
čtvrtá	32,2	4,55	14,1	13,59
pátá	24,05	3,3	13,7	10,15
šestá	44,37	6,27	14,1	18,73

Tabulka 11 Obsah kvercetinu v jednotlivých suknicích cibule

Suknice	obsah kvercetinu	obsah kvercetinu	podíl z celkového obsahu kvercetinu
	(mg/kg suš.)	(mg/kg čerst.)	(%)
suchá	5732	2299	28,3
první	3510	494	20,5
druhá	3082	424	18,1
třetí	2553	349	13,8
čtvrtá	1880	266	8,6
pátá	1490	204	4,9
šestá	1003	142	6,3

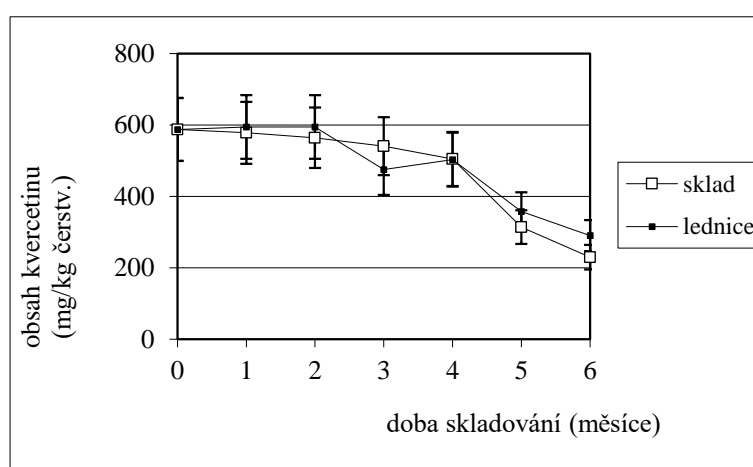
Na kvercetin jsou nejbohatší suché suknice cibule, které se bohužel kulinářsky nevyužívají. Představují sice nejmenší podíl celkové hmotnosti cibule (5,2 %), ale jejich oloupaním se ztrácí 28,3 % celkového obsahu kvercetinu v cibuli. Obsah kvercetinu v jednotlivých suknicích klesá směrem do středu cibule (tabulky 10 a 11). Obdobné výsledky uvedl Patil a Pike (1995), kteří ale v suchých suknicích analyzovaných žlutých

odrůd cibule našli koncentrace celkového kvercetinu podstatně vyšší (10-30,6 g/kg čerstvé hmoty).

6.2.2.3. Dlouhodobé skladování cibule

Vzorky zakoupené cibule žluté byly dlouhodobě po dobu šesti měsíců skladovány při podmínkách odpovídajících co nejvíce možnostem domácností. Každý měsíc byl odebrán vzorek ke stanovení celkového obsahu kvercetinu.

Obrázek 24. Pokles obsahu celkového kvercetinu při dlouhodobém skladování cibule



Tabulka 12 Obsah celkového kvercetinu v cibuli během skladování

měsíc skladování	Obsah kvercetinu (mg/kg)	
	sklad	lednice
0	588	588
1	578	594
2	564	594
3	541	475
4	505	503
5	314	358
6	230	290

Podle výsledků analýz klesá obsah celkového kvercetinu během skladování trvajícího 6 měsíců zhruba na polovinu počáteční hodnoty (obrázek 24 a tabulka 12). K poklesu dochází při skladování cibule v obou testovaných podmínkách a vzhledem k nejistotě metody není rozdíl mezi podmínkami uskladnění.

6.2.2.4. Tepelné úpravy cibule

Cibule žlutá použitá pro tepelné úpravy měla obsah celkového kvercetinu 4890 mg/kg lyofilizované sušiny. Při hodnotě sušiny 13,5 % je obsah celkového kvercetinu v čerstvém materiálu 660 mg. Rozkrájená cibule byla upečena, a byly získány tři vzorky, u kterých byl analyzován obsah celkového kvercetinu.

Tabulka 13 Obsah celkového kvercetinu v tepelně upravené cibuli

doba pečení	sušina	Obsah kvercetinu v pečeném a lyofilizovaném vzorku
	(%)	(mg/kg)
5	21,8	4770
10	28,3	5260
15	50,1	4990

Během pečení cibule ztrácela vodu a její sušina vzrostla během 15 minut tepelné úpravy z původních 13,5 % až na konečných 50,1 %. Bylo zjištěno, že rozdíly mezi jednotlivými materiály, lišícími se dobou pečení, nevybočují z rámce nejistoty měření. Tepelnou úpravou trvající 15 minut se obsah celkového kvercetinu v cibuli nemění (tabulka 13).

6.2.3. Kuchyňské úpravy ovoce

Obsah celkového kvercetinu, stanovený ve lyofilizovaném směsném vzorku bobulí bezu černého v roce 2004, činil 3140 mg/kg čerstvého materiálu. Lyofilizovaná sušina tohoto vzorku měla hodnotu 20,33 %, takže obsah celkového kvercetinu v čerstvých bobulích byl 638 mg/kg. Ve srovnání s publikovanými informacemi o obsahu kvercetinu ve třinácti kulturních odrůdách bezu černého byl tento obsah

nejvyšší. Obsah kvercetinu v testovaných odrůdách bezu černého se pohyboval od 290 do 600 mg/kg čerstvého ovoce (Kaack a Austed, 1998).

6.2.3.1. Změny obsahu celkového kvercetinu při kuchyňských úpravách

Kuchyňské úpravy bezinek zahrnovaly přípravu šťávy ve dvou variantách – neokyselené a okyselené přidavkem 0,5 % kyseliny citronové, přípravu džemů s 50% sacharózy z obou původních šťáv a skladování vyrobených džemů při dvojích skladovacích podmínkách: 6 °C a 22 °C po dobu 2 měsíců (tabulka 14).

Při přípravě džemů vařením v otevřené nádobě na síťce došlo během varu k vypaření vody. Výsledky analýzy byly pro účely srovnání přepočteny na původní hmotnost před vařením (400g).

Tabulka 14 Změny obsahu celkového kvercetinu během kuchyňských úprav

Materiál	obsah celkového kvercetinu (mg/kg výrobku)	
	varianta neokyselená	varianta okyselená
bobule	638	638
šťáva	173	164
čerstvý džem	83	86,3
džem po skladování při 6°C	60,9	65,2
džem po skladování při 22°C	58,3	64,4

Z tabulky je zřejmé, že přidavek kyseliny citronové nemá vliv na obsah celkového kvercetinu při zpracování plodů bezu.

Zajímavé bylo procentuální vyjádření obsahu celkového kvercetinu v jednotlivých výrobcích, když za základ se vzal obsah celkového kvercetinu v původních bobulích bezu. Při tomto přepočtu se eliminoval vliv ředění vodou při přípravě šťávy a cukrem při přípravě džemu (tabulka 15).

Tabulka 15 Procentuální vyjádření změn obsahu celkového kvercetinu během kuchyňských úprav

Materiál	% obsahu původního celkového kvercetinu	
	varianta neokyselená	varianta okyselená
čerstvé bezinky	100	100
šťáva	54	52
čerstvý džem	52	56
džem skladovaný při 6 °C	40	40
džem skladovaný při 22 °C	36	40

Z výsledků je vidět, že k největšímu poklesu obsahu celkového kvercetinu dochází již při prvním kroku zpracování bobulí – při přípravě šťávy. Při zvoleném způsobu přípravy šťávy byly slupky se semeny ihned po vylisování odstraněny. Vzhledem k tomu, že se dá předpokládat maximální obsah flavonoidních látek v povrchových vrstvách plodu (Davídek et al., 1983, Velíšek, 1999), zhruba 50 % původního obsahu kvercetinu v bobulích bylo ztraceno s odpadem. Při skladování džemu byl pozorován mírný pokles obsahu kvercetinu. Rozdíly v obsahu celkového kvercetinu při skladování při 6 °C a 22 °C jsou v rámci nejistoty metody a není tedy rozdíl mezi podmínkami skladování.

6.2.4. Stanovení obsahu rutinu v pohance

Materiál pohanky seté a pohanky tatarcky k analýze obsahu rutinu byl poskytnut katedrou rostlinné výroby JU v Českých Budějovicích.

Ke stanovení rutinu bylo vybráno pět odrůd pohanky seté : Pyra (ČR), Emka (Polsko), Hruszowska (Polsko), Kora (Polsko), Krupinka (Rusko) a jedna odrůda pohanky tatarcky (Z51-0014). Pěstování všech odrůd pohanky seté bylo opakováno v letech 2001 až 2003, pohanka tatarcka byla analyzována pouze v roce 2003.

Tabulka 16 Obsah rutinu v jednotlivých částech rostliny u pěti odrůd pohanky seté

	obsah rutinu		
	(g/kg lyofilizované sušiny)		
	Rok 2001	Rok 2002	Rok 2003
Květy			
Krupinka	94,2	87,2	95,5
Emka	95,3	85,3	91,2
Kora	110	82,7	98,8
Hruszowska	102	102	71,7
Pyra	96,7	73,0	87,4
Listy			
Krupinka	98,7	83,5	105
Emka	75,0	79,4	74,8
Kora	100	85,4	80,9
Hruszowska	77,8	87,8	88,7
Pyra	79,9	85,5	88,7
Stonky			
Krupinka	13,9	13,8	14,2
Emka	12,9	14,2	12,2
Kora	15,9	13,7	11,2
Hruszowska	13,1	13,5	12,7
Pyra	13,8	11,0	11,1
Nažky			
Krupinka	0,238	0,276	0,318
Emka	0,260	0,331	0,394
Kora	0,351	0,377	0,320
Hruszowska	0,321	0,276	0,277
Pyra	0,215	0,280	0,297

Tabulka 17 Obsah rutinu v jednotlivých částech rostliny pohanky tatarcky

	Rutin (mg/kg lyofilizované sušiny)
	Rok 2003
květy	126
listy	87,9
stonky	17,3
plody	20,2

Publikované údaje od různých autorů o obsahu rutinu v jednotlivých částech pohanky jsou velice rozdílné. Kreft et al. (1999) uvedl rozmezí 0,138 až 0,654 g/kg v listech a 36,2 – 58,9 g/kg v květech odrůd Siva a Petra, Minami et al. (1998) stanovil v listech neuvedené odrůdy obsah rutinu 32,3 g/kg. Lachman et al. (2000) uvedl ve směsi listů a stonků neuvedené odrůdy obsah rutinu 64,5 g/kg. Rozdíl může být způsoben také rozdílným izolačním postupem rutinu při stanovení.

Nejvyšší obsah rutinu byl nalezen u všech odrůd v listech a ve květech (tabulka 16). Ze všech analyzovaných částí pohanky mají nejnižší obsah rutinu nažky, kde obsah rutinu dosahuje maximálně hodnot kolem 0,400 g/kg lyofilizovaného materiálu u všech testovaných odrůd, nejčastěji však mezi 0,200 a 0,300 g/kg.

Obsah rutinu v pohance tatarce je nejvyšší v květech a listech tak, jako u všech odrůd pohanky seté (tabulka 17). Vyšší obsah rutinu u pohanky tatarcky byl nalezen ve stoncích a v nažkách je obsah rutinu několikanásobně vyšší.

Byla provedena statistická analýza naměřených dat (t-test), jejíž cílem bylo zjistit, zda existují statisticky významné rozdíly v obsahu rutinu v jednotlivých odrůdách pohanky, resp. v obsahu rutinu v pohance ve třech sledovaných letech. Z výpočtu vyplynulo, že není rozdíl mezi odrůdami pohanky seté, ani mezi roky pěstování.

6.2.5. Stanovení obsahu hlavních fenolických látek květu bezu černého

Květ bezu černého je velmi bohatý na fenolické látky. Podle literatury (Korbelář a Endris (1985)) je obsažen hlavně flavonoid rutin a fenolické kyseliny. Přesné

informace o obsahu účinných látek jsou poměrně zastaralé. Informace o změnách obsahu fenolických látek během různého zpracování květu bezu černého nejsou známé.

Analýza lyofilizovaného materiálu a materiálu sušeného při 22 °C (tabulka 18) získaného z květenství bezu černého přinesla základní informace o obsahu hlavních fenolických látek tohoto materiálu. Hlavním flavonoidem je rutin, jeho obsah dosahuje hodnot kolem 18 g/kg sušiny. Tato hodnota odpovídá maximálním hodnotám, uváděným v literatuře (19 g/kg sušiny-Tomko et al., 1989). Výsledky byly doplněny o informaci o obsahu volného kvercetin, který byl stanoven metodou HPLC z přímého nástřiku vzorku nebo methanolického extraktu. Toto stanovení bylo provedeno RNDr. Naděždou Vrchotovou, CSc. z Ústavu systémové biologie a ekologie AV ČR v rámci společného grantového projektu.

Wach et al., (2005) stanovovala obsah kvercetin v květu bezu černého po hydrolýze v prostředí HCl. Nalezla v květu bezu černého jen 7,9 mg kvercetin v kilogramu suchého materiálu. Tyto údaje jsou velmi nízké, což může být způsobeno pouze 20 minut trvajícím hydrolýzou použitou v práci Wach et al., (2005).

Dawidowitz et al., (2003) extrahoval sušený květ bezu černého pomocí 80 % methanolu v režimu zrychlené extrakce rozpouštědlem a našel 2,87 % (m/m) rutin. Podle této práce obsahuje materiál z květu bezu černého ještě glykosid kvercitrin (kvercetin-3-D-glukosid) v množství kolem 0,16 % (m/m).

Tabulka 18 Obsah hlavních fenolických látek v lyofilizovaném a sušeném květenství bezu černého

Květenství	rutin	celkový kvercetin	volný kvercetin
	(g/kg)		
lyofilizované	17,6	9,33	<0,002
sušené při 22 °C	17,7	8,96	<0,002

Ani v lyofilizovaném a ani v květenství sušeném při teplotě 22 °C nebyl nalezen žádný volný kvercetin. Svědčí to o tom, že při těchto podmínkách sušení nedochází k rozpadu flavonoidních glykosidů a aglykony se neuvolňují. Běžně používaný způsob

sušení květu bezu černého je tedy vhodným způsobem pro zachování obsahu fenolických látek.

6.2.5.1. Distribuce hlavních fenolických látek v jednotlivých částech květenství

Obsah rutinu a celkového kvercetinu byl stanoven v jednotlivých částech květenství, tedy v pylu, květech a tenkých stoncích. Obsah sledovaných látek v nejlustších stoncích, které se farmaceuticky nevyužívají, nebyl stanoven.

Tabulka 19 Obsah vybraných fenolických látek v jednotlivých částech květenství bezu černého

Část květenství	Obsah rutinu (g/kg sušiny)	Obsah celkového kvercetinu (g/kg sušiny)
Stonky	19,8	9,74
Květy	16,3	8,85
Pyl	4,5	3,58

Z analyzovaných částí květenství bezu černého mají nejvyšší obsah rutinu stonky, pyl obsahuje rutinu nejméně (tabulka 19).

Tabulka 20 Příspěvky jednotlivých částí květenství k celkovému obsahu vybraných fenolických látek

Část květenství	% hmotnosti celého květenství	Rutin % z celého obsahu v květenství	Kvercetin % z celého obsahu v květenství
Stonky	15,89	18,94	17,42
Květy	81,91	80,50	81,74
Pyl	2,20	0,56	0,56

Hlavní částí květenství jsou jednotlivé květy, které představují více než 80 % celkové hmotnosti květenství. Jejich příspěvek k celkovému obsahu rutinu je největší (tabulka 20). Případné ztráty hlavních fenolických látek při odběru odkvétajících

květenství, kdy jednotlivé kvítky již začínají opadávat, by byly velké. Ztráty fenolických látek vypadáním pylu z květů jsou vzhledem k jeho velmi nízkému obsahu v květenství minimální.

6.2.5.2. Obsah fenolických látek v nápojích z bezu černého

Základními zvolenými typy nápojů byl čaj, šumivý nápoj a víno. Šumivý nápoj a víno se běžně připravují a jsou oblíbené pro svoji osvěžující chuť, čaj je základní formou terapeutického využití.

Obsah všech sledovaných fenolických látek v šumivém nápoji a ve víně je srovnatelný. Fermentací je část kvercetinu uvolněna z glykosidických vazeb a vyskytuje se v nápoji ve volné formě. Podobná skutečnost byla pozorována také u červených révových vín (McDonald et al., 1998, Tsanova-Savova a Rybarova, 2002, Dadáková et al., 2003).

Tabulka 21 Obsah vybraných fenolických látek v nápojích z bezu černého

Vzorek	Obsah rutinu (mg/l)	Obsah celkového kvercetinu (mg/l)	Obsah volného kvercetinu (mg/l)
šumivý nápoj	28,9	16,5	5,45
víno	25,1	14,5	4,87
čaj	75,9	39,9	<0,2

Z testovaných nápojů je největší množství všech fenolických látek obsaženo v čaji. Čaj neobsahuje měřitelné množství volného kvercetinu. Flavonoidní glykosidy se tedy při přípravě čaje běžným způsobem nerozpadají (tabulka 21).

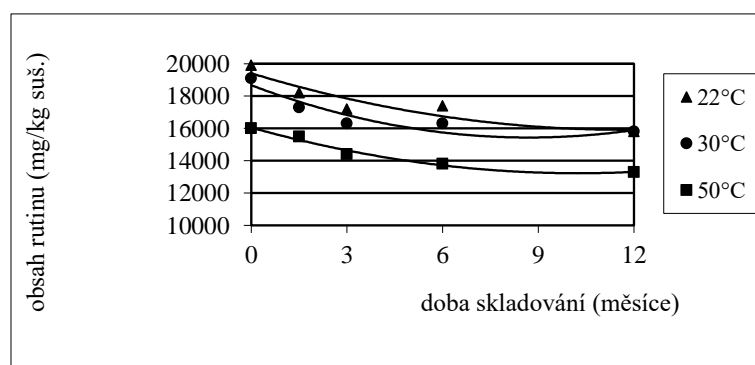
6.2.5.3. Sušení bezu při různých podmínkách a dlouhodobé skladování

Čerstvý materiál z květenství bezu černého byl usušen třemi různými způsoby. Materiál sušený při 22 °C a 30 °C si zachoval původní smetanovou barvu, při sušení při 50 °C již došlo ke změně barvy na okrovou. Obsah rutinu byl stanoven ve vzorcích vzápětí po usušení a poté v průběhu dlouhodobého skladování.

Tabulka 22 Změny obsahu rutinu během dlouhodobého skladování sušeného květu

	režim sušení		
čas (měsíce)	22 °C	30 °C	50 °C
	obsah rutinu (g/kg suš.)		
0	19,9	19,1	16,0
1,5	18,2	17,3	15,5
3	17,2	16,3	14,4
6	17,4	16,3	13,8
12	15,8	15,8	13,3

Pro srovnání výsledků byl obsah rutinu stanoven ve vzorku květenství, který byl usušen lyofilizací. Obsah rutinu v něm byl 19,8 g/kg lyofilizovaného materiálu. Při porovnávání získaných dat byla použita analýza rozptylu s následným porovnáním pomocí t-testu. Výsledky analýzy rozptylu ukázaly významné rozdíly mezi všemi teplotami sušení. Největší rozdíl byl nalezen při sušení při 22 °C a 50 °C. Výsledky pokusu potvrdily doporučení sušit bez černý při teplotách nepřesahujících 35 °C (Korbelář a Endris, 1985).

Obrázek 25. Změny obsahu rutinu během dlouhodobého skladování sušeného květu

K největšímu úbytku obsahu rutinu došlo k sušení při 50 °C. Během dlouhodobého skladování sušeného materiálu docházelo k poklesu obsahu rutinu ve všech typech materiálu (tabulka 22 a obrázek 25).

6.2.6. Obsah celkového kvercetinu v křídlatce

Všechny druhy rodu křídlatka jsou bohaté na fenolické látky. V tomto materiálu byly již stanovován obsah některých z nich, např. resveratrol a piceid (Chu et al., 2005) a antrachinonových derivátů (Matsuda et al., 2001). Obsah celkového kvercetinu zatím nebyl nikdy stanovován.

Tabulka 23 Obsah celkového kvercetinu v různých druzích rodu křídlatka

	obsah celkového kvercetinu (g/kg suš.)		
	květ	stonek	list
křídlatka česká	11,1	0,105	0,640
křídlatka japonská	16,6	0,548	4,90
křídlatka sachalinská	19,5	0,195	4,70

Ze všech analyzovaných vzorků křídlatky mají největší obsah kvercetinu květy a nejmenší obsah stonky u všech tří druhů. Křídlatka česká má v porovnání s ostatními druhy zhruba poloviční obsah kvercetinu v květech a zdaleka nejnižší obsah v listech (tabulka 23).

Ačkoliv je křídlatka počítána mezi invazní rostliny, v oblasti výzkumu biologicky aktivních fenolických látek je to materiál velmi slibný.

6.2.7. Obsah celkového kvercetinu v nápojích

Obsah celkového kvercetinu byl stanoven v několika běžně konzumovaných druzích nápojů. Zařazeny byly nápoje s obsahem šťávy z černého rybízu a jablek, červené víno, pivo, černé, zelené čaje a bylinné čaje.

Ovocné nápoje byly nakoupeny s ohledem na obsah ovocného podílu. Pro srovnání byla analyzována domácí jablečná šťáva získaná lisováním směsi jablek a šťáva z černého rybízu.

Tabulka 24 Obsah celkového kvercetinů v nápojích s obsahem jablečné šťávy

Nápoj	ovocný podíl (%)	obsah celkového kvercetinů (mg/l)
kupovaný		
	12,5	<2
	30	<2
	50	4,9
	100	8,7
domácí šťáva		
	100	11

Tabulka 25 Obsah celkového kvercetinů v nápojích s obsahem šťávy z černého rybízů

Nápoj	ovocný podíl (%)	obsah celkového kvercetinů (mg/l)
kupovaný		
	12,5	<2
	20	<2
	25	10
	25	5,7
domácí šťáva		
	50	17

U jablečných nápojů obsah celkového kvercetinů roste s rostoucím obsahem ovocné složky (tabulka 24). Obsah kvercetinů bude ale záviset na odrůdě jablek použité k výrobě moštu, protože různé odrůdy jablek mají různý obsah celkového kvercetinů (Hertog et al., 1992b). Nápoje s obsahem černého rybízů obsahují maximálně 25 % ovocné složky, protože černý rybíz je chuťově velmi výrazný. Podle výsledků analýz se zdá, že v těch nápojích z černého rybízů, u kterých výrobce deklaruje použití více druhů ovocných složek a jednak dobarvení syntetickými potravinářskými barvivy, nebyl

kvercetin nalezen v měřitelném množství a tudíž obsahují šťávy z černého rybízu naprosté minimum (tabulka 25).

Pro analýzu obsahu celkového kvercetinu v pivu byly zakoupeny tři druhy piv: světlé výčepní (10°) Budvar, světlý ležák (12°) Budvar a tmavé výčepní Samson jako reprezentanti typů piva, které se konzumuje v České republice nejvíce.

Tabulka 26 Obsah celkového obsahu kvercetinu v základních typech českých piv

Vzorek	obsah celkového kvercetinu (mg/l)
světlé výčepní Budvar	6,5
světlý ležák Budvar	7,9
tmavé výčepní Samson	<2

Zjištěné hodnoty jsou značně vyšší, než určil ve své práci Hertog et al., (1993b). V původní práci se koncentrace kvercetinu u piva značky Heineken pohybovala pod mezí stanovitelnosti metody (0,5 mg/l).

6.2.8. Obsah kvercetinu v červeném víně.

Zájem o obsah přírodních fenolů ve víně, zejména červeném, je v posledních zhruba deseti letech podmíněn rozsáhlým rozvojem výzkumu polyfenolických látek s biologickými účinky. Zajímavost potencuje také existence tzv. Francouzského paradoxu, výživové anomálie, která spojuje nízkou incidenci onemocnění srdce a cév s umírněnou konzumací červeného vína. Révová vína jsou dlouholetou součástí lidské výživy. Hrozny a nápoje z nich vyrobené obsahují širokou paletu fenolických látek, hlavně flavonoidů, v koncentracích až několik tisíc mg/l produktu. Tyto velké obsahy vytvářejí hlavně barevné anthokyany, z ostatních se ve vínech nacházejí fenolické kyseliny, katechiny a flavonoly. Z flavanolů nejvyšších koncentrací dosahuje kvercetin.

Obsah kvercetinu byl stanovován v roce 2003 v 14 vzorcích červených vín vyrobených v České republice. Vína představovala vína pěti odrůd pěstovaných v moravské vinařské oblasti (Zweigelttribe, Svatovavřínecké, Frankovka, André a Rulandské modré) od pěti výrobců. Vína byla vyrobena v letech 2000 a 2001. Výsledky

byly doplněny o informaci o obsahu volného kvercetin, který byl stanoven metodou HPLC z přímého nástřiku vzorku. Toto stanovení bylo provedeno RNDr. Naděždou Vrchotovou, CSc. z Ústavu systémové biologie a ekologie AV ČR v rámci společného projektu.

Tabulka 27 Obsah celkového a volného kvercetin v moravských červených vínech

odrůda	producent	obsah kvercetin			
		volný	celkový	volný	celkový
		mg/l			
		2000		2001	
Zweigeltrebe	Révovín	5,0	15,8	1,23	4,49
Svatovavřínecké	Révovín	4,4	9,61	1,27	4,59
Frankovka	Révovín	3,1	12,0	1,59	5,16
Svatovavřínecké	Baloun	<0,2	2,42	<0,2	2,73
Frankovka	Baloun	<0,2	2,54	<0,2	<2
Zweigeltrebe	Blatel	*	*	0,25	2,25
André	Blatel	*	*	0,98	4,90
Svatovavřínecké	Blatel	*	*	0,99	6,81
Rulandské modré	Blatel	5,34	15,2	1,37	6,86
Svatovavřínecké	Vin.skl.Lech.	<0,2	*	1,17	3,26
Frankovka	Vin.skl.Lech.	<0,2	1,81	0,98	5,61
Rulandské modré	Forman	1,30	7,74	*	*
Frankovka	Forman	3,95	7,91	1,45	5,29
Svatovavřínecké	Forman	1,30	9,33	0,53	2,34

* vzorky nebyly dodány

Bylo zjištěno, že moravská červená vína obsahují vedle glykosidicky vázaného kvercetin také nezanedbatelné množství kvercetin volného. Toto zjištění je v souladu s výsledky dříve publikovanými (McDonald et al., 1998, Tsanova-Savova a Rybarova, 2002). Srovnání s ostatními publikovanými informacemi komplikuje skutečnost, že většina autorů stanovuje kvercetin v původním vzorku a vzorek nepodrobuje hydrolyze, takže ignoruje obsah glykosidicky vázaného kvercetin a stanovuje jen kvercetin volný. Obsah volného kvercetin se pohybuje v analyzovaném souboru vín od 10 % u Zweigeltriebe, výrobce Blatel, z roku 2001 až k 49 % celkového množství kvercetin u

Frankovky, výrobce Forman z roku 2000. Obsah celkového i volného kvercetinů byl vyšší u vzorků vín pocházejících z roku 2000. Podle meteorologických pozorování z roku 2000 byl tento rok bohatší na sluneční záření (27. světový kongres o víně, údaje z ÚSBE AV ČR). Podle srovnání s údaji z literatury, obsahují moravská červená vína více kvercetinů než bulharská (Tsanova-Savova a Rybarova, 2002), ale méně, než vína analyzovaná McDonalodem et al., (1998), která představovala rozsáhlý soubor italských, španělských, francouzských a amerických vín. Obsah celkového kvercetinů v moravských vínech je závislý na ročníku, což je zřejmé z tabulky (tabulka 27).

6.2.9. Obsah celkového kvercetinů v čaji

Obsah celkového kvercetinů byl stanoven nejprve v původním materiálu čaje. Tabulka obsahuje výsledek analýzy obsahu celkového kvercetinů a přepočtem získaný obsah celkového kvercetinů v dávce obvyklé pro přípravu čaje (zde 1,5 g). Jedna dávka ovocného čaje vážila 1,75 g.

Tabulka 28 Obsah celkového kvercetinů v některých druzích čajů

druh čaje	obsah celkového kvercetinů	
	(mg/kg)	(mg/čajová dávka)
černý čaj Ceylon Orange Pekoe (Ahmad)	2380	3,57
černý čaj Darjeeling SFTGFOP1	1360	2,04
zelený čaj Vietnam Che Thai Nguyen	1860	2,79
zelený čaj Darjeeling SFTGFOP	3720	5,58
Pu-Er (Oxalis)	1720	2,58
roibos (Vito Tea Board)	2200	3,30
bylinný čaj - směs (Megafyt)	2850	4,28
ovocný čaj Lesní plody (Leros)	624	1,09

Obsah celkového kvercetinů se v analyzovaných vzorcích čajů pohyboval od 1360 do 2380 mg/kg u čajů černých a od 1860 do 3720 mg/kg u čajů zelených. Obsah celkového kvercetinů v čaji Pu-Er nebyl ve srovnání s ostatními čaji nijak vyjimečný.

Zelené i černé typy pravého čaje obsahují kvercetin v poměrně širokém rozmezí (tabulka 28). K obdobným výsledkům dospěli Wang a Helliwell (2001). Bylinný čaj proti nachlazení má obsah kvercetinu srovnatelný s pravými čaji. U tohoto druhu čaje je vysoký obsah kvercetinu dán obsahem květu bezu černého, který je výrobcem deklarován. Ovocný čaj má ve srovnání s čaji pravými obsah kvercetinu poměrně nízký.

Z testovaných čajů byl obvyklým způsobem připraven čaj formou nálevu. Objem nálevu byl odměřen a v nápoji stanoven obsah celkového kvercetinu. Pro srovnání bylo vypočteno, jaká část celkového kvercetinu přešla při přípravě nápoje do roztoku.

Tabulka 29 Obsah celkového kvercetinu v nápojích připravených z analyzovaných čajů

druh čaje	obsah kvercetinu	objem nápoje	obsah kvercetinu v nápoji	z materiálu přešlo
	(mg/l)	(ml)	(mg/nápoj)	(%)
černý čaj Ceylon Orange Pekoe (Ahmad)	12,2	228	2,78	77,9
černý čaj Darjeeling SFTGFOP1	4,8	230	1,10	54,1
zelený čaj Vietnam Che Thai Nguyen	7,1	228	1,62	58,0
zelený čaj Darjeeling SFTGFOP	10	232	2,32	41,6
Pu-Er (Oxalis)	8,1	230	1,86	72,2
Roibos (Vito Tea Board)	6,9	228	1,57	47,7
bylinný čaj - směs (Megafyt)	19,9	225	4,48	104,7
ovocný čaj Lesní plody (Leros)	5,1	230	1,17	107,4

Největší obsah celkového kvercetinu v nápoji byl nalezen u bylinného čaje (19,9 mg/l), nápoje připravené z pravých čajů obsahovaly od 4,8 do 12,2 mg kvercetinu na litr nápoje. Nápoje připravené z pravých čajů obsahovaly kvercetin v rozmezí 41,6 až

77,9 % z obsahu kvercetinu přítomného v použité čajové dávce. U bylinného a ovocného čaje přešel do roztoku veškerý kvercetin přítomný v čaji použitém k přípravě nápoje, což je zřejmé z výsledků v tabulce 29.

7. Závěr

Závěry vyplývající z řešení zadané disertační práce lze shrnout do následujících bodů:

Byly sestaveny a optimalizovány analytické postupy vhodné pro stanovení obsahu celkového kvercetinu v rostlinném materiálu, obsahu celkového kvercetinu v nápojích a obsahu rutinu v rostlinném materiálu. Pro všechny sestavené metody byly stanoveny základní statistické parametry, mezi které patří pracovní rozsah metody, mez detekce a stanovitelnosti a byla odhadnuta hodnota rozšířené nejistoty měření.

Obsah celkového kvercetinu byl stanoven v souboru 15 druhů zeleniny a 14 druhů ovoce. V tomto souboru bylo 7 druhů zeleniny (květák, zelí bílé, mrkev, brambory, řepa červená, česnek a zelený hrášek), u nichž byl nalezen obsah kvercetinu pod mezí stanovitelnosti metody. Byl nalezen vysoký obsah celkového kvercetinu v červené paprice (138 mg/kg), žluté cibuli (359 mg/kg) a červené cibuli (610 mg/kg). Mezi analyzovanými druhy ovoce byl pouze angrešt, který měl obsah celkového kvercetinu pod mezí stanovitelnosti metody. Vysoký obsah byl nalezen u višni (75,4 mg/kg), jeřábu červeného (108 mg/kg) a bezinek (307 mg/kg). Získaný soubor představuje jediné výsledky o obsahu celkového kvercetinu v rozsáhlejší souboru ovoce a zeleniny, který byl získán metodou využívající kapilární elektroforézu. Podle srovnání získaných výsledků s obdobnými daty získanými metodou využívající HPLC dosahuje sestavená metoda dobré shody.

Obsah celkového kvercetinu byl stanoven ve dvou odrůdách cibule kuchyňské (Všetana, Karmen) a cibuli šalotce. Nejvyšší obsah celkového kvercetinu byl nalezen u šalotky (1120 mg/kg). Při analýze jednotlivých suknic cibule byl největší obsah celkového kvercetinu nalezen v suchých suknicích a v dalších suknicích se obsah kvercetinu snižoval směrem do středu cibule. Při dlouhodobém skladování cibule při teplotách 6 °C a 22 °C klesl obsah celkového kvercetinu zhruba na polovinu počáteční koncentrace bez ohledu na podmínky skladování. Při tepelné úpravě nakrájené cibule pečením trávající 15 minut se obsah celkového kvercetinu nesnížil.

Při přípravě šťávy z plodů volně rostoucího bezu černého popsáním způsobem se obsah celkového kvercetinu snížil z původní hodnoty 638 mg v kg čerstvých plodů

na 173 mg/kg výrobku bez kyseliny citrónové a 164 mg/kg výrobku s kyselinou citrónovou. Pridavek okyselující látky zřejmě neměl vliv na obsah celkového kvercetin. Obsah celkového kvercetin při zpracování bezinek na džem se snížil zhruba na 10% původního množství.

Obsah rutinu v jednotlivých částech rostliny pohanky (květy, listy, stonky, nažky) je velice rozdílný. Nejvíce rutinu, až 10 g/kg sušiny, obsahují květy a listy, nažky mají obsah rutinu maximálně kolem 400 mg/kg lyofilizované sušiny. Pohanka tatarská má obsah rutinu v květech a listech srovnatelný s pěti odrůdami pohanky seté, obsah rutinu v nažkách je asi stokrát větší.

Bylo zjištěno, že květenství bezu černého obsahuje jako hlavní flavonoid rutin. Obsah rutinu v materiálu sušeném při 22 °C se nelišil od obsahu rutinu v materiálu lyofilizovaném a dosahoval hodnot 17,6, resp. 17,7 g/kg lyofilizované sušiny. Ani v jednom materiálu nebyl nalezen žádný volný kvercetin. Po rozdělení květenství na jednotlivé části (květy, stonky a pyl) byl největší obsah rutinu (19,8 g/kg lyofilizované sušiny) nalezen ve stoncích, nejnižší (4,50 g/kg lyofilizované sušiny) v pylu. Květy obsahovaly 16,3 g rutinu v kg lyofilizované sušiny. Vzhledem k tomu, že jednotlivé květy vytvářejí hlavní část květenství (81,9 % sušiny), tvoří jejich příspěvek k celkovému obsahu rutinu v květenství také největší část (80,5 %). Fermentované nápoje připravené z čerstvého květenství bezu obsahovaly volný kvercetin, který se zřejmě uvolnil z přítomného rutinu mikrobiální činností. Čaj připravený ze sušeného květenství měl obsah rutinu 75,9 mg v litru výrobku. V tomto čaji nebyl nalezen žádný volný kvercetin. Při sušení květenství bezu při teplotě 50 °C došlo k významnému poklesu obsahu rutinu. Při skladování sušeného květenství po dobu jednoho roku obsah rutinu dále klesal.

Všechny analyzované druhy křídlatky mají vysoký obsah celkového kvercetin. Nejvyšší obsah byl nalezen v květech křídlatky sachalinské (19,5 g/kg sušiny). Křídlatka česká má ze všech analyzovaných druhů obsah celkového kvercetin nejnižší.

U analyzovaných jablečných nápojů obsah celkového kvercetin stoupal s rostoucím obsahem ovocné složky. U analyzované nápoje z černého rybízu, u kterých byl deklarovaný obsah ovocné složky menší než 20 %, byl obsah celkového kvercetin pod mezí stanovitelnosti metody. Analyzované pivo světlé výčepní mělo obsah

celkového kvercetinu nižší (6,5 mg/l) než světlý ležák (7,9 mg/l). U tmavého piva byl obsah celkového kvercetinu pod mezí stanovitelnosti metody.

Vzorky červených révových vín pocházely od pěti tuzemských výrobců a představovaly vína vyrobená v rocích 2000 a 2001. Obsah celkového kvercetinu v analyzovaných vínech se pohyboval v rozmezí od hodnoty pod mezí stanovitelnosti (2mg/l) po asi 15 mg/l. Obsah celkového kvercetinu byl vyšší u vzorků pocházejících z roku 2000. U analyzovaných vzorků byl nalezen volný kvercetin v množství 10 % až 49 % celkového obsahu kvercetinu.

Analyzované vzorky černých a zelených čajů měly obsah celkového kvercetinu v rozmezí 1360 až 3720 mg celkového kvercetinu v kg čaje. Čaj roibois měl obsah 2200 mg/kg, bylinný čaj 2850 mg/kg a ovocný čaj 624 mg/kg. U nápojů připravených z uvedených čajů popsáním způsobem se obsah celkového kvercetinu pohyboval v rozmezí 4,8 až 12,2 mg v litru nápoje. V nápoji z čaje roibos bylo nalezeno 6,9 mg kvercetinu/l. Největší obsah celkového kvercetinu měl bylinný čaj proti nachlazení (19,9 mg/l), nejnižší obsah byl stanoven v ovocném čaji (5,1 mg/l). Bylo vypočteno, že u pravých čajů a čaje roibos přechází do nálevu 41,6 % až 77,9 % celkového kvercetinu z použité čajové dávky. U čaje bylinného a ovocného je to prakticky veškerý celkový kvercetin, který je přítomen v materiálu použitém pro přípravu čaje.

8. Seznam literatury

- Aramedia M.A., García I., Lafont F., Marinas J.M.(1995): Determination of isoflavones using capillary electrophoresis in combination with electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr., A*, 707, 327-333.
- Atkinson M.D., Atkinson E.(2002): *Sambucus nigra* L., *J. Ecol.* 90, 895-923.
- Atwell B., Kridemann P., Turnbull C.(1999): *Plants in Action*. Mac Milan Education, South Yarra, Austrálie.
- Aussenac T., Lacombe S., Daydé J.(1998): Quantification of isoflavones by capillary zone electrophoresis in soybean seeds: effect of variety and environment. *Am. J. Clin. Nutr.*, 68, 1480-1485.
- Barefoot J.C., Grønþæk M., Feaganes J.R., McPherson R.S., Williams R.B., Siegler I.C.(2002): Alcoholic beverage preferences, diet, and health habits in the UNC Alumni Heart Study. *Am. J. Clin. Nutr.*, 76, 466-472.
- Berhow M.A., Vaughn S.F.(1999): Higher plant flavonoids: Biosynthesis and chemical ecology. *Principles and Practises of Plant Ecology*. CrC Press. Illinois, USA, str. 423-438.
- Brolis M., Gabeta B., Fuzzati N., Pace R., Panzeri F., Peterlongo F.(1998): Identification by high-performance liquid chromatography diode array detection mass spectrometry and quantification by high-performance liquid chromatography UV absorbance detection of active constituents of *Hypericum perforatum*. *J. Chromatogr. A*, 825, 9-16.
- Canalon P.F., Bryan Ch.R.(1993): Use of capillary electrophoresis for monitoring citrus juice composition. *J.Chromatogr. A*, 652, 555-561.
- Cao Y., Chu Q., Fang Y., Ye J.(2002): Analysis of flavonoids in *Ginkgo biloba* L. and its phytopharmaceuticals by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Anal. Bioanal. Chem.*, 374(2), 294-299.
- Cao Y., Zhang X., Fang Y., Ye J.(2001): Determination of active ingredients of *Apocynum venetum* by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Mikrochim. Acta.* 137, 57-62.
- Careri M., Elviri L., Mangia A., Musci.(2000) : Spectrophotometric and coulometric detection in the highperformance liquid chromatography of flavonoids and optimization of sample treatment for the determination of quercetin in orange juice. *J.Chromatogr. A*, 881, 449-460.
- Castellari M., Matricardi L., Arfelli G., Galassi S., Amati A.(2000): Level of single bioactive phenolics in red wine as a function of the oxygen supplied during storage. *Food Chem.*, 69, 61-67.
- Cook N.C., Samman S.(1996): Flavonoids – chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary source. *J. Nutr. Biochem.*, 7, 66-76.

Couch J.F., Naghski J., Krewson Ch.F.(1946): Buckwheat as a source of rutin. Science, 103 (2668), 197-198.

Crozier A., Jensen E., Lean M.E.J., Mc Donald M.S.(1997): Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography J.Chromatogr. A, 761 (1-2), 315-321.

ČSN ISO 8466-1 (1993): Kalibrace a hodnocení analytických metod a určení jejich charakteristik. Část 1: Statistické hodnocení lineární kalibrační funkce. Český normalizační institut, Praha.

Dadáková E., Procházková E., Křížek M.(2001): Application of micellar electrokinetic capillary chromatography for quantitative analysis of quercetin in plant materials. Electrophoresis, 22, s.1573-1578.

Dadáková, E., Vrchotová, N., Tříška, J., Kyseláková M.(2003): Stanovení volného a celkového kvercetinu v moravských červených vínech. Chem. Listy, 97, 558-561.

Davídek J. (1981): Laboratorní příručka analýzy potravin. SNTL Praha, 228-229.

Davídek J., Janíček G., Pokorný J. (1983) : Chemie potravin, SNTL Praha, str.255.

Dawidowitz A.L., Wianowska D., Gawdzik J., Smolarz D.H.(2003): Optimization of ASE condition for the HPLC determination of rutin and isoguercitrin in *Sambucus nigra* L., J. Liq. Chromatogr. Rel. Tech., 26 (14), 2381-2397.

da Silva J., Herrmann S.M., Heuser V., Peres W., Possa Marroni N., González-Gallego J., Erdtmann B(2002): Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. Food Chem. Toxicol., 40, 941-947.

de Simón B.F., Estrella I., Hernández T.(1995): Flavonoid separation by capillary electrophoresis – effect of temperature and pH. Chromatographia. 41 (7-8), 389-391.

Dietrych-Szostak D., Oleszek W.(1999): Effect of processing on the flavonoid content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) grain. J. Agric. Food Chem., 47(10), 4384-4387.

Dolník V.(1994): Úvod do kapilární elektroforézy. Ústav analytické chemie AV ČR, Brno.

Fernandez J.B., Griffiths D.W., Bain H.(1996): The evaluation of capillary zone and micellar electrokinetic capillary chromatographic techniques for simultaneous determination of flavonoids, cinnamic and phenolic acids in blackcurrant (*Ribes nigrum*) bud extracts. Phytochem. Anal., 7, 97-103.

Ferreres F., Blázquez M.A., Gil M.I., Tomás-Bárberán F. A.(1994): Separation of honey flavonoids by micellar electrokinetic capillary chromatography. J. Chromatogr. A, 669 (1-2), 268-274.

Forkmann G.(1991): Flavonoids as a flower pigments – the formation of the natural spectrum and extension by genetic engineering. Plant Breed., 106, 1-26.

Formica J.V., Regelson W.(1995): Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. Food Chem. Toxicol., 33(12), 1061-1080.

- Frankel E.N., Kanner J., German J.B., Parks E., Kinsella J.E.(1993): Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet*, 341, 454-457.
- Gamache P., Ryan E., Acworth I.N.(1993): Analysis of phenolic and flavonoid compounds in juice beverages using high-performance liquid-chromatography with coulometric array detection. *J.Chromatogr.*, 635 (1), 143-150.
- García-Viguera C., Bridle P.(1995): Analysis of non-colored phenolic-compounds in red wines – a comparison of high performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis. *Food Chem.*, 54(4), 349-352.
- Gee J.M., Dupot M.S., Rhodes M.J.C., Johnson I.T.(1998): Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. *Free Radical Biol. Med.*, 25(1),19-25.
- Gil M.I., García-Viguera C., Bridle P., Tomás-Bárberán F.A.(1995): Analysis of phenolic compounds in Spanish red wines by capillary zone electrophoresis. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.*, 200, 278-281.
- Goldberg, D.M., Karumanchiri, A., Soleas G.J., Tsang E.(1999): Concentrations of selected polyphenols in white commercial wines. *Am. J.Enol.Vitic.*, 50(2), 185-194.
- Häkkinen S.H., Kärelampi S.O., Heinonen I.M., Mykkänen H.M., Törrönen A.R.(1998): HPLC method for screening of flavonoids and phenolic acids in berries. *J. Agric. Food Chem.*, 77 (6), 543-551.
- Häkkinen S.H., Kärelampi S.O., Heinonen I.M., Mykkänen H.M., Törrönen A.R.(1999): Content of the flavonol quercetin, myricetin and kaempferol in 25 edible berries. *J. Agric. Food Chem.*, 47 (6), 2274-2279.
- Harborne J.B.(1965): Plant Polyphenols XIV. Characterisation of flavonoid glycosides by acidic and enzymic hydrolyses. *Phytochemistry*. 4, 107-120.
- Hasler C.M.(2000): The changing face of functional foods. *J.Am. Coll. Nutr.* 19(5), 499-506.
- Hässig A., Liang W.X., Schwabl H., Stampfli K.(1999): Flavonoids and tannins: plant-based antioxidants with vitamin character. *Med. Hypotheses*, 52 (5), 479-481.
- Hawryl M.A., Hawryl A., Soczewinski E.(2002): Application of normal- and reversed-phase 2D TLC on a cyanopropyl-bonded polar stationary phase for separation of phenolic compounds from the flowers of (*Sambucus nigra L.*). *JPC*, 15, 4-10.
- Hertog M.G.L., Hollman P.C.H., Venema D.P.(1992a): Optimization of a quantitative determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 1591-1598.
- Hertog M.G.L., Hollman P.C.H., Katan M.B.(1992b): J. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *Agric. Food Chem.*, 40, 2379-2383.
- Hertog M.G.L., Feskens E.J.M., Hollman P.C.H., Katan M.B., Kromhout D.(1993a):Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *Lancet*, 342, 1007-1011.

- Hertog M.G.L., Hollman P.C.H., van de Putte B.(1993b): Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines and fruit juices. *J. Agric. Food Chem.*, 41, 1242-1246.
- Hertog M.G.L., Kromhout D., Aravanis Ch., Blackburn H., Buzina R., Fidanza F., Giampaoli S., Jansen A., Menotti A., Nedeljkovic S., Pekkarinen M., Simic B., Toshima H.(1995): Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the Seven country study. *Arch. Intern. Med.*, 155, 381-386.
- Hertog M.G.L., Sweetnam, P.M., Fehily A.M., Elwood P.C., Kromhout D.(1997): Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of men: the Caerphilly study. *Am. J. Clin. Nutr.* 65, 1489-1494.
- Hilhorst M.J., Somsen G.W., de Jong G.J.(1998): Potential of capillary electrophoresis for the profiling of propolis. *J. High Resolut. Chromatogr.*, 21(11), 608-612.
- Holasova M., Fiedlerova V., Smrcinova H., Orsak M., Lachman J., Vavreinova S.(2002): Buckwheat – the source of antioxidant activity in functional foods. *Food Res. Int.*, 35, 207-211.
- Holman P.C.H., Hertog M.G.L, Katan M.B.(1996): Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chem.*, 57 (1), 43-46.
- Holman P.C.H., Katan M.B.(1998): Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man. *Arch. Toxicol.*, 20, 237-248.
- Chen, H., Zuo Y., Deng Y.(2001): Separation and determination of flavonoids and other phenolic compounds in cranberry juice by high-performance liquid chromatography. *J.Chromatogr. A*, 913 (1-2), 387-395.
- Cheung H.Y., Lai W.P., Cheung M.S., Hood D.J., Fong W.J.(2003): Rapid and simultaneous analysis of some bioactive components in *Eucommia ulmoides* by capillary electrophoresis. *J.Chromatogr. A*, 989, 303-310.
- Chu X., Sun A., Liu R. (2005): Preparative isolation and purification of five compounds from the Chinese medicinal herb *Polygonim cuspidatum* Sieb.et Zucc. by high speed counter current chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1097, 33-39.
- Justesen U., Knuthsen P., Leth T.(1998): Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *J.Chromatogr. A*, 799, 101-110.
- Justesen U., Knuthsen P.(2001): Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes. *Food Chem.*, 73(2), 245-250.
- Kaack K., Austed T. (1998): Interaction of vitamin C and flavonoids in elderberry (*Sambucus nigra* L.) during juice processing. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 52, 187-198.
- Kader F., Rovel B., Cirardin M., Metche.(1996): Fractionation and identification of the phenolic compounds of Highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum. L.*). *Food Chem.*, 55(1), 35-40.
- Kalač P., Míka V.(1997): Přírodní škodlivé látky v rostlinných krmivech. ÚZPI, Praha.

- Karakaya S., Nehir El S.(1999): Quercetin, luteolin, apigenin and kaempferol contents of some foods. *Food Chem.*, 66, 289-292.
- Kindl H., Wöber G.(1981): *Biochemie rostlin*. Academia Praha, str.270-290.
- Kolesnikov M.P., Gins V.K.(2001): Phenolic substances in medicinal plants. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 37 (4), 392-399.
- Korbelář J., Endris Z.(1985): *Naše rostliny v lékařství*. Avicenum, Praha.
- Kreft S., Knapp M., Kreft I.(1999): Extraction of rutin from buckwheat (*Faipyrum esculentum* Moench) Seeds and Determination by capillary electrophoresis. *J. Agric. Food Chem.*, 47 (11), 4649-4652.
- Kulomaa A., Sirén H., Riekkola M.-L.(1997): Identification of antioxidative compounds in plant beverages by capillary electrophoresis with the marker index technique. *J. Chromatogr.A*, 781, 523-532.
- Lachman J., Orsák M., Pivec V., Faustusová E.(2000): Content of rutin in selected plant sources. *Sci. Agric. Bohem.*, 31 (2), 89-99.
- Lachman J., Pivec V.(1996): Flavonoids in the flowers of wild dogwood (*Cornus mas* L.). *Sci. Agric. Bohem.*, 27 (2), 105-111.
- Lapčík O., Hill M., Cerny I., Lachman J., Al-Maharik N., Adlercreutz H., Hampl R.(1999): Immunoanalysis of isoflavonoids in *Pisum sativum* and *Vigna radiata*. *Plant Sci.*, 148(2), 111-119.
- Li S., Zhang Q.H.(2001): Advances in the development of functional foods from buckwheat. *Critic. Rew. Food Sci. Nutr.*, 41(6), 451-464.
- Liang H.-R., Sirén H., Jyske P., Riekkola M.-L., Vuorela P., Vuorela H., Hiltunen R.(1997): Characterization of flavonoids in extracts from four species of *Epimedium* by micellar electrokinetic capillary chromatography with diode-array detection. *J. Chromatogr. Sci.*, 35, 117-125.
- Liang H.-R., Sirén H., Riekkola M.-L., Vuorela P., Vuorela H., Hiltunen R.(1996): Optimized separation of pharmacological active flavonoids from *Epimedium* species by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A.*, 746, 123-129.
- Liebich H.M., Lehmann R., Di Stefano C., Haring H.U., Kim J.H., Kim K.R.(1998): Analysis of traditional Chinese anticancer drugs by capillary electrophoresis. *J.Chromatogr. A*, 795, 388-393.
- Lin Y. Y., Ng K. J., Yang S.(1993): Characterization of flavomoids by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, 629 (2), 389-393.
- López M., Martínez F., Del Valle C., Orte C., Miró M.(2001): Analysis of phenolic constituents of biological interest in red wines by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 922 (1-2), 359-363.
- MacDonald R.S., Guo J.Y., Copeland J., Browning J.D., Slepser D., Rottinghaus G.E., Berhow M.A.(2005): Environmental influences on isoflavones and saponins in soybeans and their role in colon cancer. *J. Nutr.* 135 (5), 1239-1242.

- Matsuda H., Shimoda H., Morikawa T., Yoshikawa M. (2001): Phytoestrogens from the roots of *Polygonum cuspidatum* (*Polygonaceae*): Structure requirement of hydroxyanthraquinones for estrogenic activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 11, str. 1939-1942.
- McDonald M.S., Hughes M., Burns J., Lean M.E.J., Matthews D., Crozier A.(1998): Survey of the free and conjugated myricetin and quercetin content of red wines of different geographical origins. *J. Agric. Food Chem.*, 46 (2), 368-375.
- Mc Ghie T.K., Markham K.R.(1994): Separation of flavonols by capillary electrophoresis – effect of structure on electrophoretic mobility. *Phytochem. Anal.*, 5 (3), 121-126.
- Merken H.M., Beecher G.R.(2000): Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent flavonoid aglycons. *J. Chromatogr.A.*, 897, 177-184.
- Middleton E., Kandaswami Ch.(1993): *The Flavonoids: Advances in research since 1986*. Edited by J.B. Harborne. Chapman and Hall, London, Velká Británie.
- Minami M., Kitabayashi H., Ujihara A.(1998): Quantitative analysis of rutin in buckwheat (*Fagopyrum sp.*) by high performance liquid chromatography. *J.Fac. Agric. Shinshu University*, 34(2), 91-94.
- Pánek J., Pokorný J., Dostálová J., Kohout P. (2002): *Základy výživy*. Svoboda Servis, Praha, str. 90-93.
- Pastene E.R., Bocaz G., Peric I., Montes M., Silva V., Riffo E.(2000): Separation by capillary electrophoresis of C-glycosylflavonoids in *Passiflora sp.* extracts. *Bol. Soc. Chil. Quim.*, 45, 461-467.
- Patil B.S., Pike L.M. (1995): Distribution of quercetin content in different rings of various coloured onion (*Allium cepa*L.) cultivars. *J. Hortic. Sci.*, 70 (4), 643-650.
- Patil B.S., Pike L.M., Yoo K.S. (1995): Variation in the quercetin content in different colored onions (*Allium cepa*L.). *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 120 (6), 909-913.
- Pereira C.A., Yariwake J.H., Lancas F.M., Wauters J.N., Tits M., Angenot L.(2004): *Phytochem. Anal.*, 15(4), 241-245.
- Picinelli A., Suárez B., Mangaz J.J.(1997): Analysis of polyphenols in apple products. *Z. Lebensm.- Unters. Forsch.*, 204, 48-51.
- Pietta P.G., Mauri P.L., Rava A., Sabbatini G.(1991): Application of micellar electrokinetic capillary chromatography to the determination of flavonoid drugs. *J.Chromatogr.*, 549, 367-373.
- Pietta P.G., Bruno A., Mauri P.L., Rava A.(1992): Separation of flavonol-2-O-glycosides from *Calendula officinalis* and *Sambucus nigra* by high-performance liquid and micellar electrokinetic capillary chromatography. *J.Chromatogr.*, 593, 165-171.
- Prasongsidh B.C., Skurray G.R.(1998): Capillary electrophoresis analysis of *trans*- and *cis*-resveratrol, quercetin, catechin and gallic acid in wine. *Food Chem.*, 62(3), 355-358.

- Price K.R., Prosser T., Richetin A.M.F., Rhodes M.J.C.(1999): A comparison of the flavonol content and composition in dessert, cooking and cider-making apples, distribution within the fruit and effect of juicing. *Food Chem.*, 66, 489-494.
- Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J. a kolektiv (1998): *Fyziologie rostlin*. Academia Praha, str.412-431.
- Ritchey J.G., Waterhouse A.L.(1999): A standard red wine: monomeric phenolic analysis of commercial Cabernet Sauvignon wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 50(1), 91-100.
- Rodríguez-Delgado M.A., Pérez M.L., Corbella R., González G., Montelongo F.J.G.(2000): Optimization of the separation of phenolic compounds by micellar electrokinetic capillary chromatography. *J.Chromatogr. A*, 871, 427-738.
- Rodríguez-Delgado M.A., Malovaná S., Pérez J.P., Borgez T., Montelongo F.J.G.(2001): Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection. *J.Chromatogr. A*, 912 (2), 249-257.
- Rodríguez-Delgado M.A., González-Hernández G., Conde-González J.-E., Pérez-Trujillo J.-P.(2002): Principal component analysis of the polyphenol content in young red wines. *Food Chem.*, 78 (4), 523-532.
- Ruidavets J.B., Teissedre P.L., Ferrieres J., Carando S., Bougard G., Cabanis J.C.(2000): *Atherosclerosis*, 153(1), 107-117.
- Sakakibara H., Honda Y., Nakagawa S., Ashida H., Kanazawa K.(2003): Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits and teas. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 571-581.
- Shihabi Z.K., Kute T., Garcia L.L., Hinsdale M.(1994): *J. Chromatogr. A*, 680, 181-185.
- Shui G., Loeng L.P.(2002): Separation and detection of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 977, 89-96.
- Schieber A., Keller P., Carle R.(2001): Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 910 (2), 265-273.
- Schilcher H., Hagels H.(1996): *Zur pharmakokinetik und zum metabolismus von flavonoiden*. Phytopharmaka II, Steinkopf Verlag Darmstadt.
- Soczewinski E., Hawryl M.A., Hawryl A.(2001): Retention behavior of some flavonoids in 2D-TLC systems on cyano bonded polar phases. *Chromatographia*, 54, 789-794.
- Stanley L.L., Maizer M.J.P. (1999): Potential explanation for the French paradox. *Nutr. Res.*, 19(1), 3-15.
- Stecher G., Huck CH.W., Popp M.(2001): Determination of flavonoids and stilbenes in red wines. *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 371, 73-80.
- Suchánek, M.(2001): Stanovení nejistoty analytického měření. Eurachem-ČR, Praha.

- Suschetet M., Siest M.-H., Le Bon A.-M., Canivenc-Lavier M.-C.(1998): Anticarcinogenic properties of some flavonoids. Polyphenols 96, Edited by INRA, Paris.
- Svatoš A. (2002): Úvod do chemie přírodních látek. in: Chemie a biochemie přírodních látek, ÚOCHB, Praha, str. 1-24.
- Tijburg L.B.M., Mattern T., Folts J.D., Weisgerber U.M., Katan M.B.(1997): Tea flavonoids and cardiovascular diseases: A review. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 37(8), 771-785.
- Tomko J., Kresánek J., Hubík J., Suchý V., Felklová M., Sikita B., Libický A.(1989): Farmakognózia. Osveta Martin, 186-187.
- Trichopoulou A., Vasilopoulou E., Hollman P., Chamalides Ch., Foufa e., Kaloudis Tr., Krombout D., Miskaki Ph., Petrochilou I., Poulima E., Stafilakis K., Theophilou D.(2000): Nutritional composition and flavonoid content of edible wild greens and green pies: a potential rich source of antioxidant nutrients in the Mediterranean diet. Food Chem., 70, 319-323.
- Trichopoulou A., Vasilopoulou E., Lagiou A.(1999): Mediterranean diet and coronary heart disease: Are antioxidants critical? Nutr.Rew., 57(8), 253-255.
- Tsanova-Savova S., Ribarova F.(2002): Free and conjugated myricetin, quercetin, and kaempferol in bulgarian red wines. J. Food Comp. Anal., 15, 639-645.
- Urbánek M., Blechtová L., Pospíšilová M., Polášek M.(2002): On-line coupling of capillary isotachopheresis and capillary zone electrophoresis for the determination of flavonoids in methanolic extract of *Hypericum perforatum* leaves or flowers. J. Chromatogr. A, 958, 261-271.
- Velíšek J. (1999): Chemie potravin. Osis Tábor.
- Vinas P., López-Erroz C., Marín-Hernández J.J., Hernández-Córdoba M.(2000): Determination of phenols in wines by liquid chromatography with photodiode array and fluorescence detection. J. Chromatogr. A, 871, 85-93.
- Wach A., Pyrzyńska K., Biesaga M.(2005): Quercetin content in some food and herbal samples. Food Chem. in press.
- Wang H., Helliwell K. (2001): Determination of flavonols in green and black tea leaves and green tea infusions by high-performance liquid chromatography. Food Res. Int., 34, 223-227.
- Watanabe M.(1998): Catechins as antioxidants from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). J. Agric. Food Chem., 46 (3), 839-845.
- Whittle N., Eldridge H., Bartley J., Organ G.(1999): Identification of the polyphenols in barley and beer by HPLC/MS and HPLC/electrochemical detection. J. Inst. Brew., 105 (2), 89-100.
- Žďárek J. (2002): Fyziologické a ekoogické funkce přírodních látek. in: Chemie a biochemie přírodních látek, ÚOCHB, Praha, str. 25-78.

9. Seznam publikací

9.1. Původní práce

Dadáková E., Procházková E., Křížek M.(2001) : Application of micellar electrokinetic capillary chromatography for quantitative analysis of quercetin in plant material. *Electrophoresis*, 22, s.1573-1578.

Dadáková, E., Vrchotová, N., Tříška, J., Kyseláková M.(2003) : Stanovení volného a celkového kvercetinu v moravských červených vínech. *Chemické listy*, 97, 558-561.

9.2. Práce prezentované na konferencích

Dadáková, E., Procházková, E. (2000): Použití metody MECC pro kvantitativní analýzu kvercetinu. In : *Pokroky v chromatografii a elektroforéze*, Pardubice, s.84.

Dadáková E. (2001) : Obsah kvercetinu v běžných druzích ovoce a zeleniny pěstovaných v České republice. In : *Biologicky aktivní fenolické látky v zemědělských plodinách*. Praha-Ruzyně, s. 76-81.

Dadáková E., Kalinová J. (2002) : Rutin determination in different varieties of buckwheat using micellar electrokinetic capillary chromatography. In : *Modern analytical methods for food and beverage authentication*. Lednice, s. 46.

Dadáková, E., Vrchotová, N., Tříška, J. (2003): Dominantní fenolické látky květu bezu černého (*Sambucus nigra L.*). In : *Chromatographic methods and human health*. Piešťany, 73-74.

Dadáková, E., Kalinová (2004), J.: The determination of rutin content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum Moench.*). In: *Agroregion 2004. Collection of Scientific Papers*, Faculty of Agriculture in České Budějovice. 2004, 21, 191-194.

Vrchotová, N., Šerá, B., Tříška, J., Dadáková, E., Kužel, S.(2004): Polyphenols in *Reynoutria* Houtt. Genus. In: *COST D28 MC Action 2004*, Siena. Italy, P-26.

Vrchotová, N., Šerá, B., Tříška, J., Dadáková, E., Kužel, S.(2004): Phenolic Compounds in the Leaves of *Reynoutria* Houtt. Genus. In: *Polyphenols Communications 2004*, Helsinki, Finland, 811-812.

Kalinová, J., Dadáková, E.(2004): Varietal Differences of Rutin in Common Buckwheat (*Fagopyrum esculentum Moench.*) Determined by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography. In: *Advances in Buckwheat Research. Proceedings of the 9th International Symposium on Buckwheat*, Prague, 719-722.

Vrchotová, N., Šerá, B., Tříška, J., Dadáková, E., Kužel, S.(2005): Biologically active compounds as a possible cause of invasibility of knotweeds (*Reynoutria ssp.*) from eastern Asia. In: *2005 BCPC Symposium Proceedings No. 81: Plant Protection and Plant Health in Europe: Introduction and Spread of Invasive Species.*, Berlin, 289-290.

Dadáková, E., Vrchotová, N., Tříška, J., Chmelová, Š. (2005): Stability of Main Phenolic Compounds of Elder (*Sambucus nigra* L.). In: Vitamins 2005 – Targeted Nutritional Therapy., Pardubice, 92.

9.3. Grantové projekty

Vypracování metodiky pro kvalitativní a kvantitativní analýzu flavonoidů v různých potravinách a materiálech. IG ZF JU č. 02/00, řešitel : Dadáková E., obhájeno 17.1.2001.

Stanovení obsahu vybraných flavonoidů v ovoci, zelenině a některých alternativních zemědělských plodinách. IG JU č. 02/01, řešitel : Dadáková E., obhájeno 22.1.2002.

Změny obsahu flavonoidu kvercetinu během kuchyňských úprav vybraných druhů ovoce a zeleniny. IG ZF JU č. 12/02, řešitel : Dadáková E., obhájeno 22.1.2003.

MSM 6007665806 : Trvale udržitelné způsoby zemědělského hospodaření v podhorských a horských oblastech zaměřené na vytváření souladu mezi jejich produkčním a mimoprodukčním uplatněním. Věcný okruh : Možnosti ovlivnění obsahu vybraných zdravotně významných látek v zemědělských produktech a potravinách. Řešitel : doc.ing. Martin Křížek, CSc., spoluřešitel ing. Eva Dadáková

Vliv vybraných faktorů na obsah flavonoidů a dalších fenolických látek v některých léčivých rostlinách. GAČR 525/05/2546, řešitel : ing. Eva Dadáková, spoluřešitel RNDr. Naděžda Vrchotová, CSc., ÚSBE, AV ČR

10. Přílohy

Eva Dadáková
Eva Procházková
Martin Křížek

Department of Chemistry,
Faculty of Agriculture,
University of South Bohemia,
České Budějovice,
Czech Republic

Application of micellar electrokinetic capillary chromatography for quantitative analysis of quercetin in plant materials

A simple method for the routine determination of quercetin in biological samples was developed. The method consists of hydrolysis of bonded quercetin, its isolation and preconcentration on solid-phase extraction (SPE) column and a final analytical step using micellar electrokinetic capillary chromatography. The working range, linear range, the limit of quantification, and the measurement uncertainty were tested in validation. The method is suitable for quercetin determination in fruit and vegetable samples.

Keywords: Flavonoids / Quercetin / Micellar electrokinetic capillary chromatography / Plant material
EL 4370

1 Introduction

Flavonoids represent a large group of plant phenols. Currently more than 4000 flavonoid compounds are known and new ones are being found. Flavonoids are derived from heterocyclic 2-phenylbenzopyrone. Commonly all three cycles are substituted by hydroxyl groups or methoxy groups and discrete derivatives differ in the stage of substitution and oxidation. Natural flavonoids occur usually in the *O*-glycosidic form. Free aglycones are seldom found. Hydrolysis of glycosides resulting in the increase of aglycone's concentration can occur especially during the technological treatment of foods, at higher temperatures and under acidic conditions [1].

Flavonols, the subgroup of flavonoids represented mainly by quercetin (Fig. 1) and kaempferol, are abundant in fruits and vegetables [2–4]. Flavonoids act as an important component of antioxidative systems preventing from the formation of lipid peroxiradicals, eliminating free oxygen radicals, binding and inactivating some metal cations (iron, copper) [5, 6]. The antioxidative activity of flavonoids depends on the number and the position of hydroxyl groups as well as their glycosylation in the molecule.

Optimum radical-scavenging activities have been found for an *o*-dihydroxy structure in the B-ring, 2,3 double bond, 4-oxo function in the C-ring, and 3- and 5-OH groups in the A- and C-rings [7]. Flavonols combine these features. Showing these properties, flavonoids can prevent diseases originating in oxidative damage of biologi-

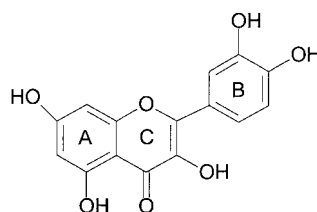


Figure 1. Structure of quercetin

cal structures (cardiovascular diseases, atherosclerosis) [7]. Appropriate structure of alimentation with elevated contents of flavonoids could help in the prevention and in combating these diseases [5]. For the flavonoids analysis, methods enabling separation of complex mixtures of similar compounds should be used. Usually HPLC is being applied [8]. The use of capillary zone electrophoresis (CZE) is frequent [9]. Prior to HPLC or CZE analysis flavonoids are either extracted from samples using an organic solvent [10] or hydrolysed [4, 11]. Acid hydrolysis enables the liberation of all aglycones from respective flavonoid glycosides.

Capillary electrophoresis and especially micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC) are methods suitable for analysis of complex mixtures of natural organic substances having a similar chemical structure. As flavonoids and their aglycones are weakly polar compounds, MEKC seems to be a more convenient method for the determination. This method enables optimum determination of flavonoid compounds in food samples or drugs. Filtered liquid samples are sometimes applied directly to the analyser [12]. Vine samples [13] as well as solid samples [14] can be extracted by diethyl ether or methanol, respectively. Ferreres *et al.* [15] proposed an analysis of honey by pre-separation of flavonoids on Amberlite. Solid-phase extraction (SPE) on C-18 columns

Correspondence: Eva Dadáková, Department of Chemistry, University of South Bohemia, Studentská 13, České Budějovice, 370 05, Czech Republic
E-mail: dadakova@zf.jcu.cz
Fax: +0420-38-530-04-0

Abbreviation: TBHC, *t*-butylhydroquinone

followed by elution of pre-concentrated flavonoids by methanol is probably the most acceptable way of pre-separation [8].

Due to the fact that there exists a plethora of flavonoid compounds, it is very likely, that most of natural samples would contain a characteristic flavonoid pattern. The determination of each component of such mixture would be difficult, especially with respect to the standard compounds availability. As flavonoids contain only several kinds of aglycones, there might be a solution of this task by converting glycosides to the respective aglycones by acid hydrolysis followed by the determination of the aglycones by MEKC. The total amount of aglycones would correspond to the total amount of all kinds of flavonoids in given material. The aim of this work was to examine the possibilities of the determination of quercetin in natural samples. The method is based on the acid hydrolysis of sample followed by the MEKC determination.

2 Materials and methods

2.1 Chemicals

All chemicals were of analytical grade. Quercetin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany); sodium tetraborate, *t*-butylhydroquinone (TBHQ) (Fluka, Buchs, Switzerland); acetylsalicylic acid, boric acid, phosphoric acid, benzoic acid, tungstophosphoric acid, methanol, sodium hydroxide (Lachema, Brno, Czech Republic); 1-naphthylacetic acid (Spolana, Neratovice, Czech Republic); salicylic acid (Merck, Darmstadt, Germany); sodium dodecyl sulfate (SDS) (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA). Deionized water was prepared with Premier (Premier Systems, Phoenix, AZ, USA). For pH measurements a LogR-meter m.370 (Orion Res. Inc., Boston, MA, USA) was used. Glas filters Nr. S7 were by Filpap (Hostin , Czech Republic). The SPE columns LiChrolut RP-18, RP-18 end-capped, NH₂, CN, Si (Merck), LC-Ph (Supelco, Bellefonte, PA, USA) were flushed with 3 × 2.5 mL methanol and 4 × 2.5 mL water prior to use.

2.2 Standard solutions

Solutions of quercetin standard (1 mg/mL) and of the internal standard 1-naphthylacetic acid (2 mg/mL) were prepared by dissolving the substance in 100% methanol. These stock solutions were stored in the refrigerator (4°C) and were used after appropriate dilution. The stability of standard solutions was tested by their spectra measurements (200–350 nm) every week. It was found, that under above-mentioned conditions the solutions are stable at least for 6 months.

2.3 Samples

Samples of fruits and vegetables were obtained from a private producer from central Bohemia. We used apples (variety "Prusvitne letni"), early white cabbage, and cauliflower. Natural products were not chemically treated, fertilized only with natural fertilizers, and harvested at maturity optimal for consumption. Material for analysis was washed and uneatable parts (stalks, cores etc.) were discarded. Samples were cut to 5 mm thick pieces and freeze-dried (24 h, -46°C, 0.25 mbar). The dried material was stored in the freezing box (-18°C) in closed containers.

2.4 Apparatus

Analyses were carried out on Spectraphoresis 2000, a fully automated system for CZE equipped with a multi-wavelength UV-Vis scanning detector (Thermo Separation Products, Fremont, CA, USA). Separations were achieved in plain fused-silica capillary of 70 cm length (67 cm effective length to the detector) × 75 µm ID (CElect FS75 CE column; Supelco). Data processing was performed using Spectacle and PC 1000 CE software Version 3.0. Injection of the samples was achieved by a 2 s vacuum application. Approximative volume of the sample injected was 12 nL. The applied voltage (+20 kV) resulted in an electrophoretic current of 30 µA and the temperature around the capillary was maintained constant by the Peltier system at 25 ± 0.01°C. The wavelength of detection was set at 270 nm. The separation buffer consisted of 10 mM boric acid, 10 mM sodium tetraborate, 20 mM SDS, 15% methanol, pH 9.2. A new capillary was washed for 5 min with 1 M NaOH at 45°C, 5 min with 0.1 M NaOH at 45°C, and 20 min with water at 25°C. After each sample injection the capillary was postwashed for 2 min with 0.1 M H₃PO₄ at 45°C, 2 min with 0.1 M NaOH at 45°C, and 5 min with water at 25°C.

2.5 Sample preparation

The method of hydrolysis is based on literature [3]. For hydrolysis, 0.5 g of grinded freeze-dried sample in a flask is mixed with ascorbic acid solution (80 mg in 7.5 mL water). When the sample is imbibed with the liquid, 12.5 mL of methanol and 5 mL of 6 M HCl are added. Samples are boiled in a water bath under reflux cooler for 2 h, the temperature of the water bath is maintained on 90°C. After 10 min of cooling to the room temperature, the hydrolysed sample is neutralized by the addition of 2 g NaHCO₃ and transferred to a beaker by 7.5 mL of methanol and 100 mL of water. The volume in the beaker is made up to 200 mL by water and pH of the mixture is adjusted to pH 3.0 by the saturated NaHCO₃ solution. To

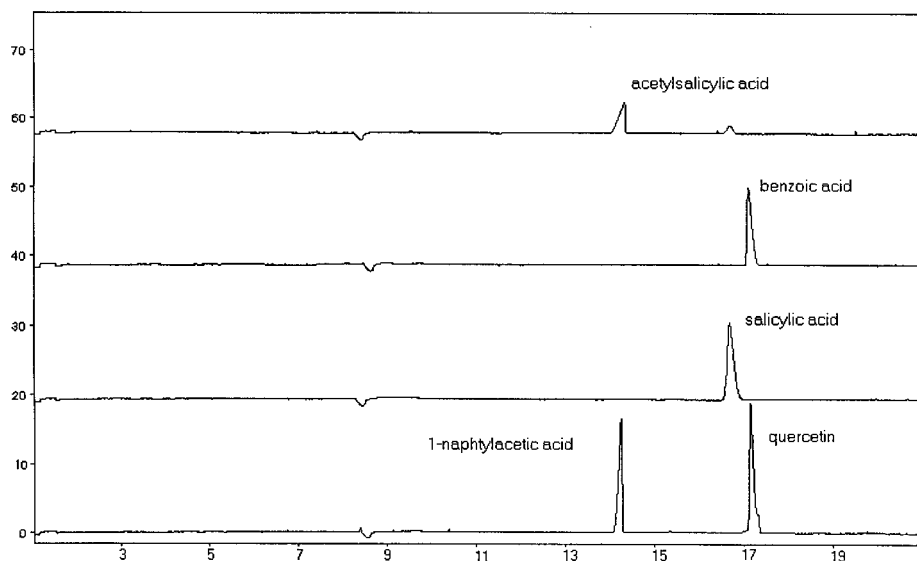


Figure 2. Electropherogram of four tested internal standards and quercetin. Separation conditions: buffer, 10 mM boric acid, 10 mM sodium tetraborate, 20 mM SDS, 15% v/v methanol; 25°C, voltage, +20 kV; wavelength, 270 nm; hydrodynamic injection, 2 s.

this sample 2 mL of 5% m/m tungstophosphoric acid solution are added. After 15 min the mixture is filtered through glass fibre filters. The cake is rinsed with 5 mL of methanol. The filtrate is made up to 500 mL by water. SPE columns (RP-18) were used for isolation of quercetin. Before use each column was washed with 4×2.5 mL of methanol and 4×2.5 mL of water. The flow rate of the sample through the column was set to 15 mL/min. Sample was applied onto the column, then the column was washed with 4×2.5 mL of water and dried for 15 min by air aspiration. The SPE column was eluted by 2×0.7 mL of methanol. The resulting solution on the vial is spiked with 0.1 mL of the internal standard solution (1-naphthylacetic acid, 2 mg/mL in methanol). This solution represents the sample for MEKC analysis.

3 Results and discussion

3.1 Optimization of the determination

In capillary electrophoresis, the hydrodynamic injection is probably the most frequently used way of sample introduction. The reproducibility of this kind of injection is sometimes not satisfactory. The use of internal standard helps to overcome the above-mentioned problems. Among compounds possessing similar chemical and analytical properties as quercetin in selected systems, the benzoic, salicylic and 1-naphthylacetic acids seemed to be the most promising. Further experiments showed that the 1-naphthylacetic acid has optimal properties (Fig. 2).

For the quercetin determination the borate buffer (pH 9.2) was chosen. When real samples were analyzed in this plain borate buffer, interference of the analyte and other

constituents of the sample was observed. For improving the partition effect, the organic modifier is sometimes beneficial [15, 16]. Four different concentrations (0, 5, 10 and 15%) of methanol were tested. The addition of methanol (15% v/v) to the borate buffer improved the resolution. The total analysis time does not exceed 20 min. The hydrolysis of the total flavonoid glycosides results in the liberation of quercetin which is further isolated and preconcentrated on SPE columns. The sample is then ready for MEKC determination.

3.2 Optimization of the sample preparation

The sample subdued to hydrolysis should be spiked with an antioxidant to prevent the analyte from the oxidative degradation. We tested the antioxidative properties of TBHCH [3] and ascorbic acid [17]. TBHCH was excluded due to its interference with the analyte in MEKC. The ascorbic acid did not show any negative properties in the MEKC system. The hydrolysed sample contains an abundance of colloid particles. These substances are not removed by filtration and in further step they clog SPE columns. Colloid particles must be precipitated by the proper agent and together with insoluble fraction removed by filtration. For this purpose, we examined the effect of the Carres reagent and tungstophosphoric acid [18] followed by vacuum filtration through paper filter or glass fibre filters. The Carres reagent was suitable for filtration through paper filters, but the recovery of quercetin was poor, probably due to quercetin adsorption on paper. Samples treated with the Carres reagent clogged the glass fibre filters. The best results were obtained with tungstophosphoric acid and filtration through glass fibre filters. Six types of SPE columns were proved (LiChrolut

RP-18, RP-18 end-capped, NH₂, CN, Si (Merck), LC-Ph (Supelco)). The best recovery of quercetin was achieved on RP-18 columns. Table 1 describes the recovery of quercetin on several types of SPE column.

Table 1. Recovery of quercetin on six SPE columns

SPE column	RP-18	RP-18 E	NH ₂	CN	Si	Ph
Recovery (%)	79	33	0	3	0	62

Columns: RP-18, LiChrolut RP-18 Merck; RP-18 E, LiChrolut RP-18 end-capped Merck; NH₂, LiChrolut RP-18 Merck; CN, LiChrolut RP-18 Merck; Si, LiChrolut RP-18 Merck; Ph LC-Ph Supelco

3.3 Method validation

3.3.1 Working range

One of the important objectives was to confirm the suitability of the method for the intended purposes. In this part of our work, the following parameters were taken into consideration: working range, linear range, limit of quantification, and measurement uncertainty. The working range was proposed for the concentration range of 3–100 µg/mL according to the expected quercetin contents in samples [4, 11]. The ratio of quercetin peak area and the peak area of the internal standard was considered as analytical response. Conformably to ČSN ISO 8466-1, the values of residuals of the standard deviation for linear ($s_{y1} = 0.0159$) and nonlinear ($s_{y2} = 0.0167$) calibration functions do not significantly differ. Moreover, the non linear function does not represent an important improvement in data fitness; the use of the linear function is acceptable.

3.3.2 Limit of detection

The limit of detection was determined by triplication of the average standard deviation of ten independent determinations of samples with quercetin content approaching the expected detection limit. For the assessment of the quantification limit the average standard deviation was decoupled. The assessment of the detection limit and the quantification limit are 0.5 µg/mL and 1.5 µg/mL, respectively. For practical use, the quantification limit is considered to be 2 µg/mL.

3.3.3 Measurement uncertainty

The measurement uncertainty was calculated as duplicate of the relative standard deviation of ten independent determinations of samples with quercetin contents

approaching the lower (3 µg/mL) and the upper (100 µg/mL) limit of the working range. The measurement uncertainty was 5.3 and 4.5% for the lower and the upper limit of working range, respectively. From these values the measurement uncertainty was totalized and considered to be 10% [19].

3.3.4 Recovery

Due to the number of steps preceding analysis it is very likely, that some losses of analyte during the sample preparation may occur. For the recovery calculation the spiked matrix samples were used. According to literature data [11] confirmed by our observations, homogenized cauliflower samples contained the quercetin content below the detection limit. Samples of 0,5 g of freeze-dried cauliflower were spiked with quercetin standard in concentrations covering the whole working range of the method. Spiked samples were processed by the same way as other natural samples. The average value of the 40 samples recovery was 75% with the an RSD value of 4.4%. We did not observe any relation between the amount of the added quercetin and the recovery. When searching the reasons for the losses of quercetin in the sample preparation steps, we found that approximately 8% of quercetin were not eluted from the SPE column by methanol. The next 17% is not probably sorbed on the SPE column. The sorption on the walls was not observed. Due to the fact, that the recovery is constant over the whole calibration range, the constant recovery of 75% is taken in to consideration in all calculations.

3.3.5 Robustness

The method is robust enough if small differences in the standard method do not significantly affect the results. Based on the practical experience with the method development, the following parameters were assessed as critical: the time of column drying, sample pH before precipitation and filtration, the volume of solution used for precipitation, and the shelf life of the extract prior analysis.

(i) Residual moisture: Model samples were analyzed by standard way. The water content was determined by gravimetric analysis after 5, 10, 15 and 20 min of drying. After 10 min of drying, the column contains about 40 mg of water. It was proved that this amount had no significant influence on the quercetin recovery. The 15 min drying time in the standard method is sufficiently long.

(ii) Shelf life of the extract: Extracted quercetin was stable in the refrigerator (4°C). No decrease of analyte was observed in four weeks.

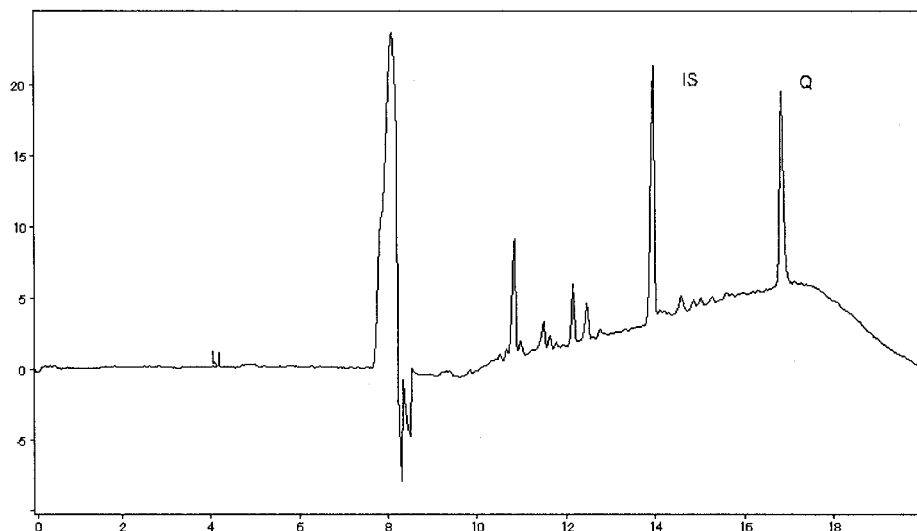


Figure 3. Electropherogram of fruit sample (apple “Prusvitné letní”). Separation conditions as described in Section 2.4.

(iii) The sample pH value: Before precipitation, the pH value is set to 3.0. The experiments revealed that fluctuations of pH within 2.8–3.2 do not exercise apparent influence over the quercetin recovery. The precision of pH meters enables easily to maintain pH within that safe range.

(iv) The coagulant volume: The coagulant volume might affect the analysis results. The ± 0.1 mL volume variations of this additive did not affect the quercetin recovery. As the pipette error is less than ± 0.02 mL, we suppose this method to be robust enough to the fluctuation of the coagulant solution.

3.4 Determination of quercetin in real samples

Biological material (fruits, vegetables) processed by the described method gave extracts, which were analyzed by the MEKC method. The quercetin content was calculated from the analytical response and the equation of the calibration function. The calibration curve is periodically updated for each series of samples. Data for calibration were acquired from analyses of methanolic solutions containing quercetin in concentrations of 0, 3, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100 $\mu\text{g/mL}$. Each solution contained 200 $\mu\text{g/mL}$ of internal standard. The ratio of quercetin peak area and the peak area of the internal standard was the relative analytical response. For the measured data the least squares line ($y = a + bx$) was calculated (y , analytical response; x , concentration of quercetin in the extract).

The concentration of quercetin in the extract was calculated as follows:

$$x = (P_Q/P_{IS} - a)/b \quad (1)$$

where a , b are the coefficients of the calibration line, P_Q is the peak area of quercetin, P_{IS} is the peak area of internal standard, and x is the concentration of quercetin in the extract ($\mu\text{g/mL}$). This concentration was recalculated with respect to the dry matter content in the sample:

$$c = x \cdot V/m \cdot 100/z \quad (2)$$

where c is the quercetin content in the sample (mg/kg of dry matter), x is the concentration of quercetin in the extract calculated from the calibration curve ($\mu\text{g/mL}$), V is the volume of the extract (mL), m is the mass of the freeze-dried sample (g), and z is the recovery (75% considered) (%). The results are easily convertible to the fresh weight values. Two examples of electropherograms of biological samples are shown in Figs. 3 and 4.

The method described in this paper was used for samples of apples, cabbage, and cauliflower. The cauliflower samples did not contain detectable amounts of quercetin, which is consistent with literature data [11]. This was the well-founded reason for using cauliflower as matrix sample. The quercetin content in apples was found to be $33 \pm 3 \text{ mgkg}^{-1}$ of fresh weight, which is in accordance with literature data ($36 \pm 19 \text{ mgkg}^{-1}$ [11]). The quercetin content in cabbage was $7 \pm 1 \text{ mgkg}^{-1}$. The higher value of 110 mgkg^{-1} in literature [11] can be explained by the difference between the growing season of cabbage samples. Contrary to Hertog *et al.* [11], our samples of cabbage were cultivated in early spring in greenhouse. The method will further be used for a large-scale study of quercetin content in fruits and vegetables in the human diet with respect to the importance of flavonoids for human nutrition.

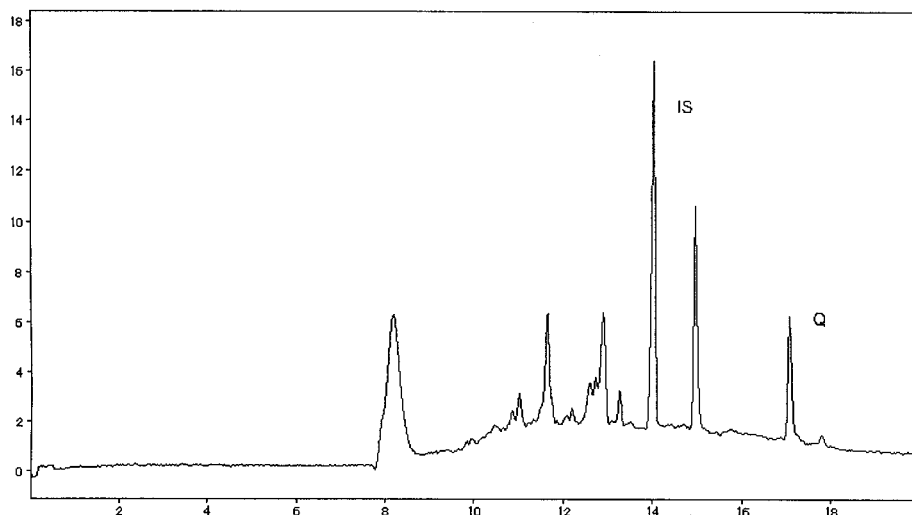


Figure 4. Electropherogram of vegetable sample (early white cabbage). Separation conditions as described in Section 2.4.

4 Concluding remarks

A method for the determination of quercetin in biological samples was developed. The method consists of hydrolysis of bonded quercetin, its isolation and preconcentration on SPE column and a final analytical step using MEKC. The working range, linear range, the limit of quantification and the measurement uncertainty were tested in validation. It was proved that the method has a sufficient robustness for the quercetin determination in plant samples.

The work was done and financially supported by CEZ J06/98:122200002 and COST 917.

Received October 10, 2000

5 References

- [1] Davídek, J., Janíček, G., Pokorný, J., *Food Chemistry*, SNTL, Prague 1983, p.255 (in Czech).
- [2] Pierpoint, W. S., in: Cody, V., Middleton, E. Jr., Harborne, J. B. (Eds.), *Plant Phenols in Biology and Medicine*, Alan R. Liss, New York 1986, pp. 125–140.
- [3] Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H., Venema, D. P., *J. Agric. Food Chem.* 1992a, 40, 1591–1598.
- [4] Häkkinen, S. H., Kärenlampi, S. O., Heinonen, I. M., Mykkänen, H. M., Törrönen, A. R., *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 2274–2279.
- [5] Hässig, A., Liang, W. X., Schwabl, H., Stampfli, K., *Med. Hypotheses* 1999, 52, 479–481.
- [6] Middleton, E. Jr., Kandaswami, C., in: Harborne J. B. (Ed.), *The Flavonoids: Advances in Research since 1986*, Chapman and Hall, London 1993, pp. 619–645.
- [7] Suschetet, M., Siess, M.-H., Le Bon, A.-M., Canivenc-Lavier, M.-C., in: INRA (Ed.), *Polyphenols 96*, Les Colloques, Paris 1998, pp.166–204.
- [8] Merken, H. M., Beecher, G. R., *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 577–599.
- [9] Tomas-Barberan, F. A., *Phytochem. Anal.* 1995, 6, 177–192.
- [10] Brolis, M., Gabetta, B., Fuzzati, N., Pace, R., Panzeri, F., Peterlongo, F., *J. Chromatogr. A* 1998, 825, 9–16.
- [11] Hertog, G. L. M., Hollman, P. C. H., Katan, M. B., *J. Agric. Food Chem.* 1992b, 40, 2379–2383.
- [12] Cancalon, P. F., Bryan, C. R., *J. Chromatogr.* 1993, 652, 555–561.
- [13] Garcia-Viguera, C., Bridle, P., *Food Chem.* 1995, 54, 349–352.
- [14] Fernandes, J. B., Griffiths, D. W., Bain, H., *Phytochem. Anal.* 1996, 7, 97–103.
- [15] Ferreres, F., Blázquez, A., Gil, M. I., Tomás-Barberán, F. A., *J. Chromatogr. A* 1994, 669, 268–274.
- [16] Bjerregaard, C., Michaelsen, S., Mortensen, K., Sorensen, H., *J. Chromatogr.* 1993, 652, 477–485.
- [17] Häkkinen, S. H., Kärenlampi, S. O., Heinonen, I. M., Mykkänen, H. M., Törrönen, A. R., *J. Sci. Food Agric.* 1998, 77, 543–551.
- [18] Davídek, J., *Laboratory Manual of Food Analyses*, SNTL, Prague 1988, pp. 229–230 (in Czech).
- [19] Suchánek M., (Ed.), *Determination of Uncertainty of Analytical Measurements*, Eurachem-CR, Prague 1999, pp. 4–6 (in Czech).

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

STANOVENÍ VOLNÉHO A CELKOVÉHO KVERCETINU V MORAVSKÝCH ČERVENÝCH VÍNECH

EVA DADÁKOVÁ^a, NADĚŽDA VRCHOTOVÁ^b,
JAN TRÍSKA^b a MARIE KYSELÁKOVÁ^c

^aKatedra chemie, Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích a ^bÚstav ekologie krajiny, Akademie věd České republiky, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, ^cÚstav posklizňové technologie zahradnických produktů, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 691 44 Lednice

e-mail: dadakova@zf.jcu.cz, nada@uek.cas.cz, triska@uek.cas.cz, kyselm@zf.mendelu.cz

Došlo 2.4.03, přepracováno 10.4.03, přijato 19.4.03.

Klíčová slova: červená vína, kvercetin, HPLC, kapilární elektroforéza

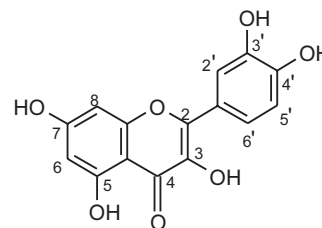
Úvod

Flavonoidy jsou početně bohatou a pestrá skupinou přírodních polyfenolických látek výhradně rostlinného původu. Podle struktury se dělí na několika skupin a mezi nejznámější zástupce patří flavonoly, katechiny a anthokyany. Vyskytují se přirozeně v ovoci, zelenině, ořechách a semenech, a tak jsou nedílnou složkou lidské potravy. Flavonoidy vykazují mnoho pozoruhodných a pro člověka zajímavých biologických účinků. V první řadě fungují jako účinné antioxidanty a jsou schopny zachytávat reaktivní radikály. Mohou vytvářet cheláty s dvojnásobnými prooxidačně působícími ionty kovů, zejména Fe a Cu. Nezanedbatelné jsou také jejich účinky antibakteriální a virostatické, protizánětlivé a vazodilatační. Antioxidačně působící flavonoidy ochraňují krevní lipidy, zejména frakci LDL, před oxidací a zabraňují tak vzniku aterosklerózy a trombotických onemocnění¹. Je prokázáno, že dostatečný příjem flavonoidů a ostatních polyfenolů vyváženou stravou je spojen s nižším výskytem onemocnění srdce a cév².

Z velkého počtu přírodních flavonoidů se ve významnějších koncentracích v přírodním materiálu vyskytuje jen několik. Mezi ně patří flavonol kvercetin (obr. 1). Jeho antioxidační schopnosti jsou díky jeho chemické struktuře mimořádné³ a je účinnějším antioxidantem než vitamíny C a E. Na druhé straně je nutno říci, že některé flavonoidy, a mezi nimi i kvercetin, vykazují nejen antioxidační aktivitu, ale v některých případech i aktivitu prooxidační. Podle nejnovějších výzkumů se zdá, že alkylace hydroxyskupiny v poloze 7 zvyšuje záchyt

radikálů a naopak kvercetin a jeho deriváty s volnými hydroxyskupinami mající v části molekuly strukturu pyrokatecholu a navíc s volnou hydroxyskupinou v poloze 3 mohou za určitých okolností vykazovat prooxidační aktivitu⁴. Pro zablokování této aktivity by neměla být posledně zmíněná hydroxyskupina volná, jako je tomu např. u rutinu, jehož konzumace by tedy byla výhodnější. Otázkou také je, kolik volného kvercetinu zůstává např. v krevní plazmě po jeho přijetí potravou či nápoji. Ve studii publikované v poslední době zjistili autoři¹, že po podání kvercetinu jako přísady do bílého vína a ovocného, nebo zeleninového džusu pokusným osobám v dávce 25 mg na 70 kg váhy, se maximum obsahu konjugátů kvercetinu objevilo v krevní plazmě již 30 min po podání, přičemž podíl volného kvercetinu činil cca 20 %. Kvercetin je v rostlinném materiálu obvykle vázán na některý sacharid a vytváří tak glykosidy, které jsou rozpustnější ve vodě a stabilnější. Volný kvercetin se může vyskytovat v potravinách po některých technologických úpravách, jako je například konzervace v kyselém prostředí a mikrobiální postupy⁵.

Červené víno je bohatým zdrojem flavonoidů a ostatních polyfenolických látek a jejich obsah závisí na odrůdě révy, podmínkách pěstování révy a technologii výroby vína. V červeném víně se vyskytují zejména anthokyany vytvářející typickou barvu vína, katechiny, kvercetin ve volné a glykosidicky vázané formě a příbuzný derivát stilbenu, resveratrol. Právě tyto látky jsou z hlediska svých antioxidačních schopností hodnoceny jako nejcennější. Alkohol, kterého víno obsahuje v průměru 12 %, bývá také spojován s kladnými účinky vína na lidský organismus⁶. Výživa, která je bohatá na přírodní antioxidanty, působí příznivě při prevenci tzv. civilizačních chorob jako jsou např. onemocnění srdce a cév. Ta jsou jednou z nejčastějších příčin úmrtí. Umírněná konzumace vína, zejména červeného, je spojována s poklesem výskytu onemocnění srdce a cév. Je zřejmé, že za tento efekt je odpovědný souhrn fenolických látek obsažených ve víně. Z biologicky aktivních flavonoidů červeného vína byly dosud zkoumány zejména katechiny a resveratrol, údajů o obsahu kvercetinu ve víně je méně. Výzkum fenolických látek v červených vínech probíhá zejména ve státech s dlouhou tradicí výroby vína. U nás byla sledována moravská červená vína^{7–10}, méně pak vína české proveniencí^{8,11} a většinou byl měřen obsah resveratrolu, u některých pak obsah katechinu, epikatechinu a gallové kyseliny¹⁰. Data o obsahu kvercetinu v českých a moravských vínech chybí zcela.



Obr. 1. Strukturální vzorec kvercetinu

Experimentální část

Materiál

Všechna vína pocházela ze čtyř vinařských oblastí moravského regionu a měla jakostní stupně: jakostní, pozdní sběr a výběr z hroznů. Obsah volného a celkového kvercetinů byl stanovován v 10 vzorcích 5 odrůd z roku 2000 a v 13 vzorcích 8 odrůd z roku 2001.

Použité chemikálie

Acetonitril a methanol (LiChrosolv, Merck), trifluoroctová kyselina (TFA) a 1-naftyloctová kyselina (Fluka), SPE kolonky RP-18 (LiChrolut, Merck), borax a SDS (Sigma), kyselina boritá, HCl a NaHCO₃ (Lachema Brno), kyselina L-askorbová (Merck), kvercetin (Aldrich).

Přístroje

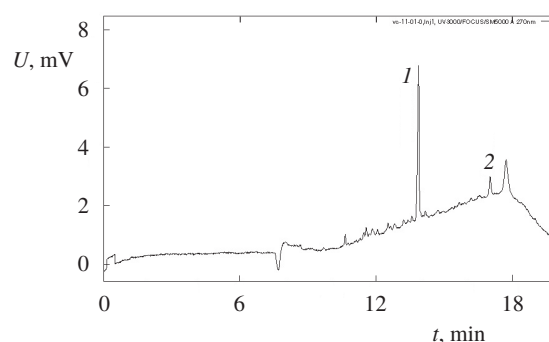
HPLC: kapalinový chromatograf HP 1050 (Hewlett-Packard, USA), kolona C18, 3 μm, 2×150 mm (Luna Phenomenex, USA), detektor s diodovým polem (HP 1040, Hewlett-Packard, USA). Nastřikovaný objem byl 5 μl.

Kapilární elektroforéza: Spectra Phoresis 2000 (Thermo Separation Product, Fremont, USA), křemenná kapilára Celest FS 75, 70 cm × 75 μm (Supelco).

Metodika

Stanovení celkového obsahu kvercetinů ve víně

Směs 2,5 ml vzorku, 12,5 ml methanolu, 5 ml 6 M-HCl, 5 ml redestilované vody a 80 mg kyseliny askorbové byla



Obr. 2. Typický elektroforeogram hydrolyzátu červeného vína; 1 – vnitřní standard, 2 – kvercetin

hydrolyzována pod zpětným chladičem 2 hodiny na vodní lázni při teplotě 90 °C. Po ochlazení byl hydrolyzát zneutralizován 2 g NaHCO₃ a převeden 12,5 ml methanolu a 100 ml vody do kádinky na 600 ml. Kyselost hydrolyzátu byla upravena roztokem NaHCO₃ na hodnotu pH 3. Hydrolyzát byl doplněn vodou na objem 500 ml a prolit kolonkou (předem kondicionovanou 10 ml methanolu a 10 ml vody) rychlostí zhruba 15 ml za minutu. Poté byla kolonka promyta 10 ml vody a sušena 15 minut procházejícím vzduchem. Kvercetin byl z kolonky eluován 1,4 ml methanolu. K eluátu bylo přidáno 0,1 ml roztoku vnitřního standardu (2 mg·ml⁻¹ 1-naftyloctové kyseliny v methanolu). Vzorky byly měřeny na kapilární elektroforéze (obr. 2). 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 nástřik 2 s.

Jako analytická odezva byl brán poměr ploch píků kver-

Tabulka I

Obsah kvercetinů v červených moravských vínech

Vzorek	Odrůda	Jakostní stupeň	Oblast	Producent	Obsah kvercetinů [mg·l ⁻¹]			
					2000		2001	
					volný	celkový	volný	celkový
1	Zweigeltrebe	jakostní	velkopavlov.	Révovín	5,02	15,79	1,23	4,49
2	Svatovavřínecké	jakostní	velkopavlov.	Révovín	4,40	9,60	1,27	4,59
3	Frankovka	jakostní	velkopavlov.	Révovín	3,08	12,00	1,59	5,16
8	Svatovavřínecké	pozdní sběr	velkopavlov.	Baloun	n.d. ^a	2,40	n.d. ^a	2,73
9	Frankovka	výběr z hroznů	velkopavlov.	Baloun	n.d. ^a	2,53	n.d. ^a	1,39
10	Zweigeltrebe	jakostní	strážnická	Blatel	^b	^b	0,25	2,25
11	André	jakostní	strážnická	Blatel	^b	^b	0,98	4,90
12	Svatovavřínecké	jakostní	strážnická	Blatel	^b	^b	0,99	6,81
13	Rulandské modré	jakostní	strážnická	Blatel	5,34	15,18	1,37	6,86
15	Svatovavřínecké	výběr z hroznů	znojemská	Vin. skl. Lech.	n.d. ^a	^b	1,17	3,26
16	Frankovka	pozdní sběr	znojemská	Vin. skl. Lech.	n.d. ^a	1,77	0,98	5,61
17	Rulandské modré	jakostní	znojemská	Forman	1,30	7,71	^b	^b
18	Frankovka	jakostní	brněnská	Forman	3,95	7,96	1,45	5,29
19	Svatovavřínecké	jakostní	brněnská	Forman	1,30	9,32	0,53	2,34

^a n.d. – pod mezí detekce, ^b vzorek nebylo možno získat

Tabulka II
Hodnoty publikovaných obsahů volného a celkového kvercetinů ve vínech

Druh vína	Země původu	Kvercetin [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]		Lit.
		volný	celkový	
Červené 1990		nestanoveno	4,1–16	2
Bílé 1990		nestanoveno	<0,5	2
Červené ^a		0,1–15,8	1,2–21,8	15
Červené	Bulharsko	0,7–4,5	2,1–7,7	16
	Španělsko	12,6–43,1 ^b	nestanoveno	12
	Španělsko (Kanárské ostr.)	8,45–25,57	nestanoveno	13

^a Dosud nejrozsáhlejší publikovaný soubor, ^b nejvyšší publikovaná hodnota

cetinu a vnitřního standardu. Kvantifikace obsahu byla provedena kalibrací. Výťažnost kvercetinů z materiálu se pohybovala pro různé typy vzorků v rozmezí 64 až 96 % a byla stanovena pro každý vzorek zvlášť metodou standardního přídatku. Detekční limit byl $0,3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Rozšířená nejistota postupu s koeficientem rozšíření 2 byla odhadnuta z rozboru dílčích nejistot jednotlivých kroků metody a činila 15 %.

Stanovení volného kvercetinů

Volný kvercetin byl stanoven pomocí HPLC, vzorek vína byl aplikován bez jakýchkoli úprav. Byla použita gradientová eluce (Mobilní fáze A: 5% acetonitril + 0,15% TFA. Mobilní fáze B: 80% acetonitril + 0,15% TFA, voda do 100%. Gradient: 25% B – 50% B, 20 min. Průtok: $2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Detekce při 250 nm (záznam snímán v rozsahu 190–600 nm). Detekční limit $0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$).

Výsledky a diskuse

Naměřené obsahy volného a celkového kvercetinů jsou uvedeny v tabulce I. Z této tabulky je zřejmé, že obsah volného kvercetinů se u měřeného souboru vzorků vín pohybuje v rozmezí od $0,25 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ do $5,34 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, obsah celkového kvercetinů pak od $1,39 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ do $15,79 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Uvedené hodnoty můžeme porovnat s hodnotami publikovanými v literatuře, jejichž přehled je uveden v tabulce II. Porovnáním námi naměřených hodnot s dosud největším naměřeným souborem 65 vzorků vín uvedeným v řádku 3 tabulky II můžeme říci, že se moravská vína nacházejí asi v první polovině hodnot tohoto souboru a nijak významně nevybočují z řady. Na druhé straně jsou zřetelné poněkud vyšší hodnoty u španělských vín^{12,13}. Z hlediska ročníku pak můžeme konstatovat, že s výjimkou dvou vzorků je u ostatních hodnot obsahu jak volného tak celkového kvercetinů zcela patrná tendence k vyšším hodnotám u ročníku 2000. Autoři zabývající se vlivem slunečního záření na obsah některých fenolických látek v hroznech a ve vínech prokázali¹⁴, že intenzita slunečního záření je určujícím faktorem pro obsah jak glykosylovaného, tak volného kvercetinů. Z námi sebraných klimatologických dat pro vystoupení na XXVIIIth World Congress of Vine and Wine⁹ vyplý-

vá, že rok 2000 byl bohatší na sluneční záření a tento fakt může být tedy jeden z důvodů vyššího obsahu obou forem kvercetinů.

Tato studie byla vypracována v rámci projektu NAZV QD 1155 „Vliv suroviny a technologie zpracování na obsah zdravotně prospěšných polyfenolických látek v révových vínech“ a MSM 122200002/2. Autoři děkují dále RNDr. J. Totuškoví, CSc., Ing. J. Veverkovi a Ing. J. Balíkovi, PhD. za zajištění vzorků měřených vín.

LITERATURA

- Goldberg D. M., Yan J., Soleas G. J.: *Clin. Biochem.* 36, 79 (2003).
- Hertog M. G. L., Hollman P. C. H., van de Putte B.: *J. Agric. Food Chem.* 41, 1242 (1993).
- Cook N. C., Samman S.: *J. Nutr. Biochem.* 7, 66 (1996).
- Kessler M., Ubeaud G., Jung L.: *J. Pharm. Pharmacol.* 55, 131 (2003).
- Davídek J., Janíček G., Pokorný J.: *Chemie potravin*. SNTL, Praha 1983.
- Frankel E. N., Kanner J., German J. B., Parks E., Kinsella J. E.: *Lancet* 341, 454 (1993).
- Totušek J., Vrchotová N., Tříška J., Marečková L.: *Chem. Listy* 94, 973 (2000).
- Kolouchová-Hanzlíková I., Melzoch K., Filip V., Šmidrkal J.: *Vitamins 2002, Pardubice, 3.–5. září 2002*, sborník konference (Blatná J., Horna A., Zima T., ed.), str. 173. Univerzita Pardubice, Pardubice 2002.
- Tříška J., Kyseláková M., Totušek J., Vrchotová N., Lefnerová N., Balík J., Veverka J.: *XXVIIIth World Congress of Vine and Wine, Bratislava, 24–28 June 2002*, str. 126.
- Tříška J., Kyseláková M., Totušek J., Vrchotová N., Lefnerová N., Balík J., Veverka J.: *XXVIIIth World Congress of Vine and Wine, Bratislava, 24–28 June 2002*, str. 125.
- Hanzlíková I., Melzoch K., Filip V., Buckiová D., Šmidrkal J.: *Proc. EUROFOODCHEM XI, Norwich, 26–28 September 2001* (Pfannhauser W., Fenwick G. R., Khokhar S., ed.), str. 220.
- Viñas P., López-Erroz C., Marín-Hernández J. J., Hernández-Córdoba M.: *J. Chromatogr., A* 871, 85 (2000).

13. Rodríguez-Delgado M.-Á., González-Hernández G., Conde-González J.-E., Pérez-Trujillo J.-P.: *Food Chem.* 78, 523 (2002).
14. Price S. F., Breen P. J., Valladao M., Watson B. T.: *Am. J. Enol. Vitic.* 46, 187 (1995).
15. Mc Donald M. S., Hughes M., Burns J., Lean M. E. J., Matthews D., Crozier A.: *J. Agric. Food Chem.* 46, 368 (1998).
16. Tsanova-Savova S., Ribarova F.: *J. Food Comp. Anal.* 15, 639 (2002).

E. Dadáková^a, N. Vrchotová^b, J. Tříška^b, and M. Kyšláková^c (^a*Department of Chemistry, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, České Budějovice*, ^b*Institute of*

Landscape Ecology, Academy of Sciences of the Czech Republic, České Budějovice, ^c*Department of Postharvest Technology of Horticultural Products, Faculty of Horticulture, Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno, Lednice*): **Determination of Free and Conjugated Quercetin in Moravian Red Wines**

Free and conjugated quercetin in Moravian red wines were determined after acid hydrolysis. The measured concentrations are in agreement with most published data in the literature. The comparison of vintage years 2000 and 2001 revealed increased concentrations of both quercetin types in 2000, which could be a consequence of a longer sunshine period in that year.

PRODÁM KOMPLETNÍCH 31 ROČNÍKŮ

Journal of Chemical Education (1964 až 1995)

ZA NABÍDNUTOU CENU

Prof. Josef Pacák (pacak@natur.cuni.cz)
