

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Stanovení obsahových látek s antioxidační
aktivitou v rostlinném materiálu**
(REŠERŠNÍ PRÁCE)

Jana Dvořáková

Vedoucí bakalářské práce: Doc. PharmDr. Hana Sklenářová

HRADEC KRÁLOVÉ, 2020

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu“

V Hradci Králové dne.....

.....

podpis

Tímto bych ráda poděkovala své školitelce Doc. PharmDr. Haně Sklenářové za vstřícný přístup, ochotu, cenné rady a tipy a rychlou zpětnou vazbu při tvorbě této bakalářské práce.

Obsah

Seznam zkratek	6
1 Úvod	8
2 Cíl a popis zadání práce	9
3 Teoretická část	10
3.1 Hlavní dělení polyfenolických látek a příklady zástupců jednotlivých skupin	10
3.2 Stanovení polyfenolů pomocí HPLC	11
3.2.1 Stacionární fáze pro HPLC separaci polyfenolů	11
3.2.2 Mobilní fáze pro HPLC separaci polyfenolů	11
3.2.3 HPLC se spektrofotometrickou detekcí	12
3.2.4 HPLC s MS detekcí	13
3.2.5 HPLC s coulometrickou detekcí	13
3.3 Přímé stanovení celkové antioxidační kapacity potravin: přístup „QUENCHER“	16
3.4 Spektrofotometrické metody	18
3.4.1 Metoda Folin–Ciocalteu	18
3.4.2 Kolorimetrické metody s chloridem hlinitým	19
4 Vybrané studie	20
4.1 Nevyužívající separaci	20
4.1.1 Vztah mezi barvou a antioxidační aktivitou ovoce a zeleniny	20
4.2 Využívající separaci	20
4.2.1 Srovnání fenolických sloučenin a antioxidačního potenciálu mezi vybranými jedlými plody a jejich listy	20
4.2.2 Komplexní hodnocení účinných polyfenolů v jablečných listech a jejich antioxidační a neuroprotektivní aktivity	21
4.2.3 Funkční vlastnosti, fenolické složky a antioxidační potenciál průmyslových jablečných výlisků jako účinná složka potravin	22
4.2.4 Chemické složení, antioxidační a protizánětlivý potenciál slupek a dužiny deseti různých odrůd hrušek	23
4.2.5 Antidiabetická aktivita u myši s diabetem typu 2 a inhibitorů α -glukosidázy, antioxidační a protizánětlivý potenciál chemicky profilovaných extraktů hruškových slupek a dužiny	23

4.2.6	Hodnocení volné antioxidační a antihemolytické aktivity kdoule obecné (Cydonia oblonga): Srovnávací studie se zeleným čajem (Camellia sinensis)	24
5	Souhrn výsledků.....	25
6	Diskuze	30
7	Závěr	32
8	Seznam použité literatury	33

Seznam zkratk

ABTS–2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát)

CEAD–Coulometric electrode array detection, coulometrická detekce elektrodového pole

DAD–detektory diodového pole

DMPD–N, N-dimethyl-p-fenylendiamin dihydrochlorid

DPPH–2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazyl

ESI–ionizace elektrosprejem

FC–Folin-Ciocalteu, činidlo a metoda používaná ke stanovení celkového obsahu fenolických látek

FRAP–Ferric Reducing Antioxidant Potencial, antioxidační síla redukující železité ionty

GAE–Galic Acid Equivalent, ekvivalenty kyseliny gallové

HDV–hydrodynamické voltamogramy

HPLC–High Performace Liquid Chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HSCCC–vysokorychlostní protiproudová chromatografická separace

IT– iontová past

LC–Liquid Chromatography, kapalinová chromatografie

MS–Mass Spectrometry, hmotnostní spektrometrie

NMR–nukleární magnetická rezonance

ORAC–Oxygen Radical Absorption Capacity, absorpční kapacita kyslíkových radikálů

PDA–Photodiode Array, detektory diodového pole

Q– kvadrupól

QE–Quercetin Equivalent, ekvivalenty kvercetinu

QTOF– hybridní hmotnostní analyzátor, spojení kvadrupólu a analyzátoru doby letu

QUENCHER–QUick, Easy, New, CHEap, Reproducible, metoda pro přímé stanovení antioxidační aktivity

RU–ekvivalenty rutinu

SPE–Solid Phase Extraction, extrakce na tuhou fázi

TAC–Total Antioxidant Capacity, celková antioxidační kapacita

TE–Trolox Equivalents, ekvivalenty troloxu

TF–Total Flavonoids, celkový obsah flavonoidů

TOF–Time of Flight, analyzátor doby letu

TP–Total Phenolics, celkový obsah fenolických látek

UHPLC– Ultra High Performance Liquid Chromatography, ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie

1 Úvod

Polyfenoly jsou nejhojnější antioxidanty přirozeně se vyskytující v rostlinné stravě. Zahrnují širokou škálu složitých struktur a vykazují antioxidační aktivitu. Základním monomerem polyfenolů je fenolický kruh. Obecně tyto látky dělíme na fenolové kyseliny a fenolové alkoholy. Dále můžeme polyfenoly řadit do mnoha tříd. Tyto hlavní třídy jsou: fenolické kyseliny, flavonoidy, stilbeny, fenolické alkoholy a lignany. Nejdůležitější skupinu však tvoří flavonoidy, které lze dále dělit do dalších tříd [1,2].

Studie na zvířatech nebo lidských buněčných kulturách podporují úlohu polyfenolů v prevenci kardiovaskulárních chorob, rakoviny, neurodegenerativních onemocnění, diabetu mellitu, hypercholesterolemie nebo osteoporózy a dalších. Účinky záleží především na jejich biologické dostupnosti. O rychlosti jejich absorpce ve střevech rozhoduje chemická struktura. Polyfenoly se objevují především v konjugované formě s jedním, nebo více cukernými zbytky, spojenými hydroxylovými skupinami. Přidružené cukry mohou být přítomny jako monosacharidy, disacharidy nebo jako oligosacharidy. Nejčastějším cukrem je glukóza, dále galaktóza, ramnóza, xylóza a arabinóza. Chemické, fyzikální a biologické vlastnosti polyfenolů jsou určovány glykosylací [1,2].

Polyfenoly mohou procházet tenkým střevem, aniž by byly absorbovány, čímž ovlivňují střevní mikroflóru tím, jak jsou biologicky přeměňovány na své relativně dostupnější metabolity. Upravují složení střevní mikroflóry jak stimulací prospěšných bakterií, tak inhibicí bakterií patogenních. Proto mohou polyfenoly v dietě pozitivně ovlivnit zdraví člověka [1].

2 Cíl a popis zadání práce

Cílem a zadáním této rešeršní práce je shromáždění informací o metodách identifikace a stanovení látek vykazujících antioxidační aktivitu, se zaměřením na látky obsažené v ovoci, především v malvicích, a jejich částech, které by mohly být využity jako alternativní zdroj antioxidantů. Dále pak porovnání použitých metod a výsledků dvaceti různých studií zabývajících se touto problematikou.

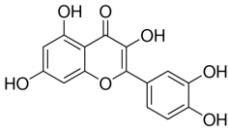
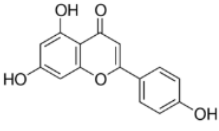
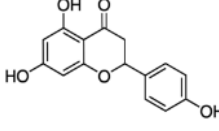
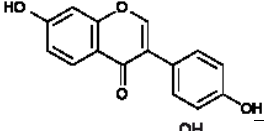
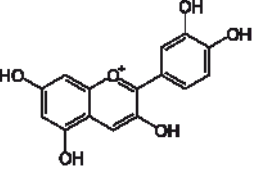
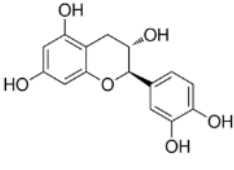
Při vybírání studií pro porovnávání byly přednostně vybírány práce publikované od roku 2009 do roku 2020. Hlavními zdroji pro čerpání informací byly databáze ScienceDirect, Web of Science a PubMed.

3 Teoretická část

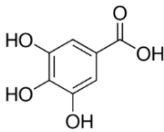
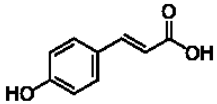
3.1 Hlavní dělení polyfenolických látek a příklady zástupců jednotlivých skupin

Nejdůležitější skupinu polyfenolů tvoří flavonoidy (tabulka 1), které lze dělit do dalších skupin. V tabulce 2 jsou uvedeni hlavní zástupci fenolických kyselin.

Tabulka 1 Hlavní zástupci polyfenolů

Flavonoidy	Zástupce	Vzorec
Flavonoly	Kvercetin	
Flavony	Apigenin	
Flavanony	Naringenin	
Isoflavony	Daidzein	
Anthokyaniny	Kyanidin	
Flavanoly	Katechin	

Tabulka 2 Fenolické kyseliny

Fenolické kyseliny	Zástupce	Vzorec
Hydroxybenzoové kyseliny	Kyselina gallová	
Hydroxyskořicové kyseliny	Kyselina p-kumarová	

[1,3]

3.2 Stanovení polyfenolů pomocí HPLC

3.2.1 Stacionární fáze pro HPLC separaci polyfenolů

Jednou z nejčastějších metod identifikace a stanovení polyfenolů je HPLC na reverzních fázích s různými typy detekce.

I přes to, že na trhu existuje mnoho druhů stacionárních fází, kolony, které byly ve vybraných studiích zvoleny pro analýzu polyfenolů, obsahovaly výhradně stacionární fáze C₁₈ s velikostí částic 5 μm, vnitřním průměrem 4,6 mm a délkou kolony většinou až 25 cm. Ve většině případů byla kolona opatřena předkolonou o různých rozměrech, pohybujících se v rozmezí délek 4–10 mm se stejnou stacionární fází, která byla použita pro separaci látek [4,5,6,7,8]. V několika málo případech byla použita stacionární fáze C₁₂ s velikostí částic 4 μm, průměrem 4,6 μm a délkou 25 cm [9,10]. Rovněž bylo k analýze polyfenolů využito i systému UHPLC s velikostí částic 1,5 μm, průměrem 2,1mm a délkou kolony 50 mm [11]. Výběr stacionárních fází nebyl ve vybraných studiích nijak odůvodněn, ale vycházel z předchozích studií.

3.2.2 Mobilní fáze pro HPLC separaci polyfenolů

Výběr mobilní fáze byl ve vybraných studiích mnohem rozmanitější. Obecně bylo využito gradientové eluce za použití dvou rozpouštědel. Jedním rozpouštědlem o nižší eluční síle (rozpouštědlo A) a druhým o vyšší eluční síle (rozpouštědlo B). U takovýchto dvousložkových systémů retence klesá s rostoucím podílem organického rozpouštědla a s jeho klesající polaritou [12]. Často voleným rozpouštědlem, byl acetonitril v různém poměru se slabším elučním rozpouštědlem (voda, 10% acetonitril), které bylo zpravidla okyselené např. 0,1% kyselinou trifluoroctovou [13], nebo 0,5% kyselinou octovou [5]. V některých z prací byl jako rozpouštědlo A použit vodný roztok kyseliny mravenčí a jako rozpouštědlo B směs 10% kyseliny mravenčí a acetonitrilu [14]. Další často používanou mobilní fází byla pak voda a methanol, kdy se při gradientové eluci postupně navyšoval obsah methanolu [15]. Poslední používanou mobilní fází byla pak jako rozpouštědlo A zvolena voda : k. mravenčí v poměru 19 : 1 a jako rozpouštědlo B methanol [6,16]. Délka analýzy se u různých autorů liší, ale ve většině případů se pohybovala okolo 60 min.

3.2.3 HPLC se spektrofotometrickou detekcí

3.2.3.1 UV/VIS detektory

Jednoduché spektrofotometrické detektory pro HPLC jsou založeny na principu absorpce záření v oblasti UV a VIS spektra. Kvantitativní hodnocení je založeno na Lambert–Beerově zákoně.

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

(A) je absorbance, (ε) molární absorpční koeficient, (c) koncentrace absorbující složky, (l) tloušťka absorbující vrstvy.

Před každým spektrofotometrickým měřením musí být platnost Lambert–Beerova zákona ověřena pomocí kalibrační závislosti. Jeho platnost je nutným předpokladem pro správné spektrofotometrické měření [17]. K analýze polyfenolů jsou vhodnější spektrofotometrické detektory diodového pole, nebo jiné citlivější typy detekce.

3.2.3.2 Detektory diodového pole

Detektory diodového pole (PDA, DAD) snímají celé spektrum v reálném čase, aniž by byla přerušena chromatografická separace. Záření prochází štěrbinou, čočkou, clonou a měrnou detekční celou a poté se rozkládá holografickou mřížkou. Rozložené záření o určité vlnové délce je zeslabeno absorpcí v detekční cele a dopadá na fotodiody. Každá fotodioda je napojena na předem nabitý kondenzátor na určitou hodnotu. Po dopadu záření na diodu vzniká fotoelektrický proud, který vybije kondenzátor. Vzniklý fotoelektrický proud je přímo úměrný intenzitě dopadajícího záření. V další fázi dochází k opětovnému nabití kondenzátorů, kdy se měří proud, který je potřebný na dobití příslušných kondenzátorů. Velikost tohoto proudu je ukládána do paměti řídicí jednotky. Tato sekvence vybíjení a nabíjení kondenzátorů se velice rychle opakuje (10 ms na rozsah 190–600 nm) a zaznamenávají se tak údaje o absorbanci při každé vlnové délce v každém okamžiku. Spektrální rozlišení závisí na počtu diod v poli, který se pohybuje od 512 do 1024 diod. Např. při počtu 512 diod, je spektrální rozlišení 1,2 nm pro rozsah 190–800 nm. Hlavní výhodou těchto detektorů je detekce látky při jakémkoliv zvolené vlnové délce a možnost porovnávat snímaná spektra s knihovnou spekter [17].

3.2.4 HPLC s MS detekcí

Spojení hmotnostního spektrometru (MS) s chromatografickými technikami je výhodné vzhledem k citlivosti a vysoce specifické povaze MS ve srovnání s jinými chromatografickými detektory.

Hmotnostní spektrometry během procesu ionizace převádějí molekuly analytu do ionizovaného stavu, poté následuje analýza těchto iontů, případně analýza jejich fragmentů, které vznikají během ionizace, na základě poměru hmotnosti a náboje (m/z) [18]. Pro ionizaci je k dispozici několik různých technologií, při čemž při analýze polyfenolů se využívá ionizace elektrosprejem (ESI) [5, 11, 19, 20]. ESI pracuje dobře se středně polárními molekulami, a proto je dobře přizpůsobeno analýze mnoha metabolitů, xenobiotik a peptidů. Ionizace pomocí ESI je považována za měkkou ionizační techniku, kdy je analytu dodáváno relativně málo energie, a proto dochází k malé fragmentaci. Kapalný vzorek je rozprašován kovovou kapilárou, na které je udržováno napětí tak, aby se na konci kapiláry vytvořily jemné nabitě kapičky. Kapičky se působením tepla a dusíku rychle odpařují a zbytkový elektrický náboj na kapičkách se přenáší na analyty. Ionizované analyty jsou pak přenášeny do vysokého vakua hmotnostního analyzátoru. Zdroj iontů a následná iontová optika mohou pracovat v módu kladných nebo záporných iontů [18]. Jaké hmotnostní analyzátory byly ve vybraných studiích používány většinou nebylo uvedeno, některé studie využívaly hybridní analyzátory v kombinaci analyzátoru doby letu a kvadrupólu (QTOF) [11,21], nebo iontové pasti (IT) a TOF [19].

3.2.5 HPLC s coulometrickou detekcí

Využitím coulometrické detekce v kombinaci s HPLC lze stanovit snadno oxidovatelné sloučeniny, jako jsou fenolické látky, pesticidy nebo vitaminy [22]. Stejně tak lze stanovit látky s vysokým oxidačním potenciálem nebo elektro–neaktivní sloučeniny, které lze převést derivatizací na sloučeniny elektro–aktivní [17].

V počátcích byly jako coulometrické detektory používány průtokové cely s jednou pracovní elektrodou. Na pracovní elektrodě se nastaví potenciál, stanovovaná látka protéká měrnou celou detektoru a měří se náboj, který je potřebný k oxidaci nebo redukci celkového množství látky. Detektory měří odezvu elektroaktivní sloučeniny. Výsledkem těchto měření jsou sigmoidní proudové/napěťové křivky (hydrodynamické voltamogramy, HDV). Při optimálním detekčním potenciálu v limitním rozsahu HDV jsou signály úměrné koncentraci elektroaktivní látky [17, 22].

Coulometrické pracovní elektrody se vyznačují velkou plochou a malými difuzními vzdálenostmi. Velké plochy lze dosáhnout použitím skelného uhlíku, porézního grafitu, platiny nebo porézních kovů. Velká plocha povrchu elektrod vede ke zvýšení oxidace nebo redukce až na 100 % a zvyšuje citlivost chromatografického signálu. Vývoj detektorů vedl k zavedení dvou pracovních elektrod s cílem zlepšit selektivitu a citlivost detekce. U moderních coulometrických detektorů jsou elektrody uspořádány sériově. Takový detektor může být použit v režimu screeningu, kdy na první elektrodě jsou rušivé látky odstraněny oxidací nebo redukcí tak, že cílové analyty mohou být detekovány na druhé elektrodě bez rušivých vlivů. Zvláštní význam mají detektory s duálními elektrodami a elektrodovými soustavami až o 16 pracovních elektrodách [22, 23].

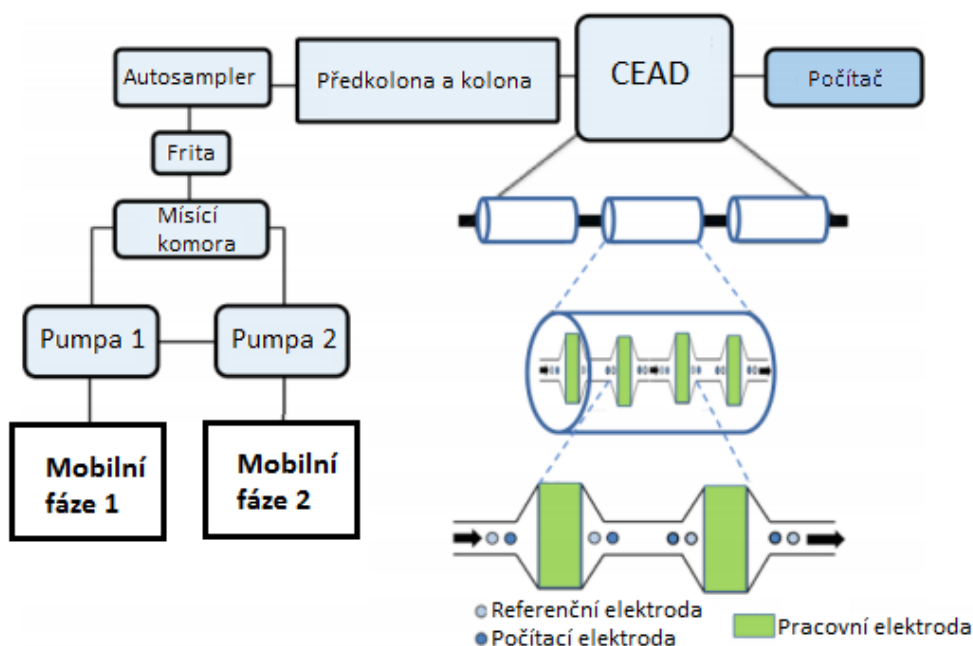
Aplikace coulometrické detekce při průtoku detekční celou vyžaduje, aby byla nejprve potvrzena elektroaktivita zkoumaných látek. Látky pak musí být odděleny izokratickým nebo gradientním způsobem v HPLC systému. HDV se získávají pomocí různých potenciálů na pracovní elektrodě. Musí se zjistit optimální detekční potenciál v limitním proudovém rozsahu a potvrdit linearitu odezvy detektoru. V případě gradientové eluce dochází k posunu základní linie, protože se mění složení mobilní fáze. Odezvu sloučenin lze ovlivnit změnou iontové síly a pH mobilní fáze [22].

3.2.5.1 *Coulometric electrode array detection (CEAD)*

Jedná se o detektor podobný spektrofotometrickému detektoru diodového pole. CEAD se skládá ze série čtyř až šestnácti coulometrických elektrod pro provedení multikanálové detekce. Systém je založen na analytických celách obsahujících platinovou referenční elektrodu, která nastaví elektrochemickou nulu, a na pracovních elektrodách, které měří sledovanou redoxní reakci. Každá analytická cela proto poskytuje signál ze čtyř kanálů. Systémy, které jsou v současnosti k dispozici, mohou nést až čtyři cely, tedy až 16 kanálů. Pracovní rozsah elektrod se může lišit od $-1,0$ do $+2,0$ V v závislosti na elektrochemických vlastnostech analytu. Dva analyty tak mohou být odděleny, pokud mají odlišné redoxní vlastnosti, přestože mají podobné chromatografické vlastnosti. Navíc neúplně oddělené sloučeniny mohou být dále elektrochemicky odlišeny, pokud se jejich půlvlnový potenciál liší o více než 60 mV [17, 23].

Coulometrické detektory jsou vysoce citlivé. Bývají často voleny k analýze polyfenolů z ovoce, protože jsou až o dva řády citlivější než UV detektory [24]. Detekce pomocí CEAD je kompatibilní se systémem na normálních i reverzních fázích. Protože je potřeba, aby byla mobilní fáze vodivá, je výhodnější použití reverzních fází. Vodivost mobilní fáze lze zvýšit přidáním chloristanů (0,05M). Na čistotu mobilní fáze jsou kladeny vyšší nároky, aby bylo dosaženo stabilní základní linie a reprodukovatelnosti výsledků. Mobilní fáze by měla být také dokonale odvdoušněná. Lze použít tzv. guard celu (porézní grafitová elektroda, na kterou je vloženo určité napětí), která slouží k odstranění elektroaktivních nečistot před vstupem na kolonu [17].

Zapojení coulometrického detektoru v HPLC systému je uvedeno na obr. 1.



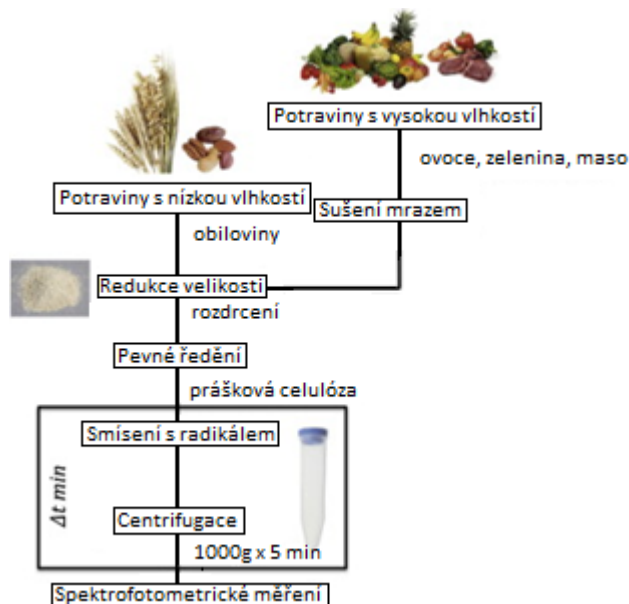
Obrázek 1 Schéma HPLC s coulometrickým detektorem [22]

3.3 Přímé stanovení celkové antioxidační kapacity potravin: přístup „QUENCHER“

K vyhodnocení antioxidační kapacity se hojně využívají metody založené na extrakci. Podmínky extrakce ale představují zdroj odchylek a v některých případech nejsou spolehlivé. Při extrakci antioxidantů z potravní matrice se setkáváme s několika úskalími. V pracích zabývajících se měřením antioxidační aktivity se používají různé extrakční postupy za předpokladu, že extrakt je reprezentativní pro skutečný antioxidační potenciál zkoumané potravin. Jednotlivé antioxidační sloučeniny však mohou být přítomny v různých formách a mohou být zcela rozpustné v daném rozpouštědle, ale také zcela nerozpustné. Proto neexistuje jedinečné rozpouštědlo nebo směs rozpouštědel, která by dokázala vyextrahovat všechny antioxidační sloučeniny přítomné v potravině. Přímý postup metody QUENCHER nahrazuje všechny časově náročné kroky extrakce.

Metoda QUENCHER QUick, Easy, New, CHEap, Reproducible je založena na přímé analýze pevných vzorků jejich smísením s volnými radikály a následným spektrofotometrickým měřením. Vzhledem k tomu, že metody používající 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát) radikál (ABTS) a 2,2'-difenyl-1-picrylhydrazyl radikál (DPPH) jsou velmi oblíbené a snadno použitelné, je metoda QUENCHER pro tyto široce zavedené testy zvláště vhodná. Konceptci však lze přizpůsobit i dalším metodikám, které se v současnosti používají pro hodnocení antioxidační aktivity, jako je antioxidační kapacita redukující železité ionty (FRAP), N,N-dimethyl-p-fenylendiamin dihydrochlorid (DMPD) a absorpční kapacita kyslíkových radikálů (ORAC).

Pevné potraviny s nízkou vlhkostí, nevyžadují před měřením antioxidační kapacity předúpravu. Potraviny s vysokou vlhkostí, jako je například ovoce, by měly být lyofilizovány, aby se odstranila voda. Vzorek se rozemele, aby se získaly jemné pevné částice. Pevné částice o velikosti 0,1–0,3 mm jsou vhodné k provedení reakce s přijatelnou rychlostí během měření antioxidační kapacity. U potravin s velmi vysokou antioxidační aktivitou se pevné částice musí ředit práškovou celulózą, aby se vešly do rozmezí linearity metody. Prášková celulóža je vůči radikálům inertní.



Obrázek 2 Schéma pracovního postupu při použití metody QUENCHER [25]

Pevné částice se pro provedení reakce smísí s roztokem radikálu. Roztok radikálu se připravuje ve směsi vody a ethanolu, aby se posílila interakce hydrofilních i lipofilních antioxidantů s radikály. Přítomnost vody v roztoku je nezbytná, protože modifikuje potravní matici, aby se radikály lépe rozptýlily do částic. Rozpustná část vzorku využívá svou antioxidační kapacitu tím, že zhasí radikály přítomné v rozpouštědle. Nerozpustná část zároveň uplatňuje svou antioxidační kapacitu pomocí povrchové reakce, která probíhá na rozhraní pevné a kapalné fáze, kdy tuhou fází představují antioxidační skupiny vázané na nerozpustnou polysacharidovou frakci a kapalnou fází představují volné radikály přítomné v rozpouštědle. Pro úplnou reakci obvykle stačí kontaktní doba 30 minut. Nakonec se směs odstředí, aby se získal opticky čirý supernatant pro spektrofotometrické měření [25]. Schéma postupu je uvedené na obr. 2.

3.4 Spektrofotometrické metody

3.4.1 Metoda Folin–Ciocalteu

Metoda Folin–Ciocalteu (FC) je hojně používaná metoda pro stanovení fenolických látek. Je založena na chemické redukci činidla (směs wolframu a oxidů molybdenu) testovanými fenolickými látkami. Reakční činidlo FC je komerčně dostupné, ale lze jej připravit i v laboratoři [26].

Příprava činidla: V 70 ml vody se rozpustí 10 g wolframanu sodného a 2,5 g molybdenanu sodného. Přidá se 5 ml 85% kyseliny fosforečné a 10 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Reflux za 10 hodin. Přidá se 15 g síranu lithného, 5 ml vody a 1 kapka bromu. Reflux 15 min. Ochladí se na pokojovou teplotu a doplní se vodou na 100 ml. V roztoku se tvoří hexavalentní komplexy fosfomolybdenové/fosfowolframové kyseliny [27].

Produkty redukce oxidu kovu mají modrou barvu, která má široký absorpční pás s maximem při 765 nm. Intenzita světla je úměrná koncentraci fenolických látek. Tato metoda založená na oxidaci fenolických sloučenin pomocí FC činidla je rychlá a snadno proveditelná.

Nevýhodou této metody je, že je nespecifická a může být ovlivněna jinými nefenolickými redukujícími molekulami, jako jsou například aromatické aminy, cukry, bílkoviny a kyselina askorbová. Dále je tato metoda určená pouze pro kvantifikaci, k identifikaci jednotlivých látek je zapotřebí využít jiných metod [26].

3.4.2 Kolorimetrické metody s chloridem hlinitým

Existují dvě široce používané metody pro kvantifikaci flavonoidů, založené na tvorbě komplexů flavonoid- AlCl_3 a následném spektrofotometrickém stanovení vzniklého barevného komplexu, který je přímo úměrný jejich koncentraci. Pro tvorbu komplexů flavonoid- AlCl_3 je rozhodujících několik faktorů (např. reakční doba), které musí být pro měření optimalizovány tak, aby se zvýšila účinnost metody v konkrétním systému [28,29].

Metoda, která zahrnuje měření při 410–430 nm po přidání roztoku AlCl_3 je selektivní pouze pro flavonoly. Roztok AlCl_3 se přidává v koncentračním rozmezí 2–10 % a lze jej aplikovat v přítomnosti kyseliny nebo acetátového roztoku, v některých případech se přidává pouze methanol nebo voda. Jako standardní sloučeniny pro vyjádření výsledků se používají různé flavonoly, nejčastěji kvercetin a rutin [29].

Druhá možnost s NaNO_2 v alkalickém prostředí, je založená na nitraci jakéhokoli aromatického kruhu nesoucího katecholovou skupinu se třemi nebo čtyřmi polohami, které nejsou obsazené, nebo stericky blokováné. Po přidání AlCl_3 se tvoří žlutý roztok komplexu, který po přidání NaOH zčervená. Hodnota absorbance se měří při 510 nm. U tohoto postupu se jako standardní sloučenina používá katechin [29].

4 Vybrané studie

4.1 Nevyužívající separaci

4.1.1 Vztah mezi barvou a antioxidační aktivitou ovoce a zeleniny

Tato studie porovnává několik druhů ovoce a zeleniny podle barvy. Barva ovoce je tedy dána obsahovými složkami. Například antokyany, které jsou jednou z hlavních fenolických skupin vyskytujících se v ovoci a zelenině, jsou zodpovědné za červenou, modrou a fialovou barvu. V této studii byl porovnán obsah polyfenolů mimo jiné v plodech jablek a hrušek. Antioxidační aktivita ovoce a zeleniny byla stanovena pomocí testu QUENCHER s použitím radikálového roztoku ABTS + a DPPH, který umožňuje stanovit celkovou antioxidační kapacitu (TAC) bez extrakční metody nebo metody hydrolýzy.

Všechny jedlé části syrového ovoce a zeleniny byly rozmixovány pomocí mixéru. Vzorky byly zředěny celulórou (1 : 1), byla změřena kapacita antioxidantů podle přístupu QUENCHER. Deset mg smíšených vzorků bylo přeneseno do zkumavky a reakce začala přidáním 10 ml pracovního roztoku ABTS+ nebo DPPH. Po důrazném protřepání v třepačce (při 350 otáčkách za minutu po dobu 27 min) ve tmě byla zkumavka odstředována při 6080×g po dobu 2 min. Po celkové 30 min reakční době se opticky čirý supernatant (2 ml) přenesl do kyvety a absorbance byla měřena při 734 nm (pro ABTS) nebo 525 nm (pro DPPH) pomocí UV–VIS spektrofotometru.

Celkový obsah polyfenolů (TP) byl vyjádřen jako mg ekvivalentu kyseliny gallové mg (GAE)/100 g hmotnosti (tabulka 4), TAC byla vyjádřena jako mmol ekvivalentu troloxu (mmol TE/kg).

Golden apple (ABTS: 10,69; DPPH: 12,06), Green apple (ABTS: 14,23; DPPH: 14,65), Red apple (ABTS: 19,24; DPPH: 21,70) a hruška (ABTS: 8,47; DPPH: 9,15) [30].

4.2 Využívající separaci

4.2.1 Srovnání fenolických sloučenin a antioxidačního potenciálu mezi vybranými jedlými plody a jejich listy

Tato studie se zabývá porovnáním antioxidantů a antioxidační aktivity v listech a plodech několika vybraných druhů ovoce, mimo jiné listy a plody jablek a kdoulí.

Identifikace a kvantifikace polyfenolů byla provedena pomocí LC–MS a metodou UHPLC spojenou s fotodiodovým detektorem a fluorescenčním detektorem. Identifikace polyfenolů (flavan–3–oly, dihydrochalkony, fenolové kyseliny, flavonoly) byla provedena pomocí UHPLC s hmotnostním spektrometrem Q–Tof Micro (ESI) pracujícím v negativním režimu. Antioxidační aktivita byla analyzována pomocí ABTS a FRAP.

Extrakty byly připravovány rozprašováním asi 0,2 g mrazem vysušených listů nebo 0,5 g ovoce do 10 ml směsi činidla obsahujícího methanol (30 ml/100 ml), kyselinu askorbovou (2,0 g/100 ml) a kyselinu octovou (1,0 ml/100 ml). Extrakty byly ponořeny do ultrazvukové lázně po dobu 15 min, ponechány po dobu 24 h při teplotě 4 °C bez světla a poté ponořeny do ultrazvukové lázně znovu, po dobu 15 min. Vzorky byly odstředovány po dobu 10 min při 4 °C a 20 000rpm a výsledný extrakt byl analyzován.

Výsledky této studie ukazují, že listy jablek a kdoulí obsahují výrazně více polyfenolů než plody. Nejvyšší koncentraci celkových polyfenolů vykazovaly kdoulové listy (hlavní obsahové látky: polymerní proanthokyanidiny) Nejsilnější antioxidační potenciál byl pozorován také u kdoulových listů: 116,49 a 65,25 mmol (TE)/100 g sušiny v testech ABTS a FRAP, které korelovaly s obsahem polymerních proanthokyanidinů a flavonolů [11].

4.2.2 Komplexní hodnocení účinných polyfenolů v jablečných listech a jejich antioxidační a neuroprotektivní aktivity

Tato studie se zabývá stanovením antioxidantů v jablečných listech. Hodnocen byl extrakt v petroletheru, ethylacetátu a extrakt v 75% ethanolu. Celkový obsah fenolických a flavonoidních látek v těchto extraktech byl stanoven metodou FC při 760 nm a kolorimetrickou metodou s AlCl₃ při 420 nm.

Kyselina gallová byla použita jako kalibrační standard a TP v každém vzorku byl vyjádřen jako mg (GAE)/g sušiny. Při použití kvercetinu jako kalibračního standardu byl celkový obsah flavonoidů (TF) v každém vzorku vyjádřen jako mg ekvivalentů kvercetinu (QE)/g sušiny extraktu (mg/g).

Z těchto tří extraktů obsahoval největší množství fenolických látek extrakt v 75% ethanolu a vykazoval nejvyšší antioxidační aktivitu při DPPH testu. Podle HPLC a vysokorychlostní protiproudové chromatografické separace (HSCCC) obsahoval 75% ethanolový extrakt pět hlavních polyfenolů: floridzin (66,1 mg/g), isokvercitrin (8,4 mg/g), kvercetin 3-O-xylosid (9,5 mg/g), kvercetin 3-O-arabinosid (10,7 mg/g) a kvercetin 3-O-ramnosid (28,5 mg/g).

Výsledky této studie ukazují, že listy jablek by mohly být využívány jako levný zdroj antioxidantů jak pro farmaceutický, tak pro potravinářský a kosmetický průmysl [19].

4.2.3 Funkční vlastnosti, fenolické složky a antioxidační potenciál průmyslových jablečných výlisků jako účinná složka potravin

Tato studie se zabývá analýzou polyfenolů v jablečném šrotu a jejich využití v potravinářství. Jablečné výlisky byly zbaveny semen a větviček a filtrovány přes mušelinovou látku. K vysušení extrahované frakce z výlisků byla použita horkovzdušná trouba, sušení na slunci a sušení mrazem, všechny vzorky byly poté rozmixovány na prášek.

Různé vzorky (5 g) byly extrahovány 100 ml příslušných rozpouštědel 50% methanolu, 50% acetonu a 50% ethanolu po dobu 30 minut při 60 °C. Extrakty byly filtrovány filtračním papírem a koncentrovány ve vakuu za použití rotačního odpařovače a lyofilizovány. Lyofilizovaný extrakt byl poté znovu rozpuštěn v methanolu.

Obsah polyfenolů byl stanoven metodou FC. Celkový obsah fenolických látek ve vzorku byl vypočten z kalibrační křivky. Celkový obsah flavonoidů byl měřen kolorimetrickou metodou s $AlCl_3$. Absorbance byla měřena po 30 minutách při 415 nm.

Identifikace a kvantifikace jednotlivých polyfenolů byla dále provedena pomocí HPLC–DAD na reverzní fázi. Analýza HPLC odhalila přítomnost kvercetinu, floridzinu a floretinu jako hlavních fenolických látek.

Nejvyšší obsah fenolických látek byl zaznamenán v mrazem sušené frakci $5,78 \pm 0,08$ mg GAE/g sušiny. Jako účinnější rozpouštědlo pro extrakci fenolických složek byl shledán 50% vodný aceton.

Z výsledků je patrné, že i odpadní produkt v potravinovém průmyslu jako je jablečný šrot, lze využít jako zdroj potravin obsahujících antioxidanty [9].

4.2.4 Chemické složení, antioxidační a protizánětlivý potenciál slupek a dužiny deseti různých odrůd hrušek

Tato práce porovnávala celkový obsah triterpenů, fenolických, flavonoidních látek mezi slupkou a dužinou deseti různých kultivarů hrušek. Mrazem sušená slupka a dužina každého kultivaru hrušky byly rozemlety na prášek (10 g) a poté extrahovány směsí methanol : voda (6 : 4, 3 x 100 ml) vždy po dobu 30 min. Poté byla suspenze přefiltrována a odpařena ve vakuu při teplotě -50°C , aby se získal pevný extrakt. Extrakce byla připravena při koncentraci 0,1 g/ml mrazem sušené hrušky v methanolu a roztok byl skladován při teplotě 4°C , dokud nebyl použit pro chemickou analýzu.

Celkový obsah fenolických sloučenin byl stanoven pomocí FC metody s minimální modifikací. Absorbance každého vzorku byla po inkubaci při 25°C po dobu 2 hod měřena spektrofotometrem při 765 nm. Obsah fenolických látek byl vypočten z kalibrační křivky s použitím kyseliny gallové jako standardu. Celkový obsah flavonoidů byl měřen pomocí kolorimetrické metody s AlCl_3 při 506 nm. Jako standard byl vybrán rutin.

U slupky se celkový obsah fenolických látek pohyboval v rozmezí od 1121,5 do 263,6 mg (GAE)/100 g, zatímco celkový obsah flavonoidů se pohyboval v rozmezí od 1682,7 do 281,2 mg rutinu (RU)/100 g. Pokud jde o dužinu, byly mezi deseti odrůdami hrušek pozorovány velké rozdíly v hodnotách obsahu fenolických látek a flavonoidů. Obecně byl obsah všech chemických složek nalezených v hruškové slupce přibližně 6–20–krát vyšší než v dužině hrušky. Výsledky analýzy naznačují, že slupka hrušky by mohla být vynikajícím zdrojem polyfenolů [4].

4.2.5 Antidiabetická aktivita u myši s diabetem typu 2 a inhibitorů α -glukosidázy, antioxidační a protizánětlivý potenciál chemicky profilovaných extraktů hruškových slupek a dužiny

V této práci bylo stanoveno celkové množství fenolických kyselin kolorimetrickou metodou FC s kyselinou gallovou jako standardem. Hruškové extrakty (0,1 ml, 0,1 g/ml sušiny), které byly zředěny 6 ml vody, byly smíseny s 1 ml 10% roztoku Na_2CO_3 a 1 ml FC činidla. Po dvouhodinové inkubaci při teplotě 25°C byla absorbance každého vzorku měřena pomocí spektrofotometru při 765 nm.

Pro stanovení celkového množství flavonoidů byla použita metoda s AlCl_3 s využitím rutinu jako standardu. Jeden ml methanolového extraktu hrušky (0,1 g/ml sušiny) byl smíchán se 4 ml 70% ethanolu a 0,3 ml roztoku NaNO_2 (5% w/v). Po 5 min byl přidán 0,3 ml (10% w/v) roztoku AlCl_3 . Po dalších 6 min byly přidány 2 ml roztoku 1 M NaOH. Objem byl doplněn na 10 ml 70% ethanolem. Poté byla absorbance měřena proti slepému vzorku při vlnové délce 510 nm.

Identifikace a stanovení celkového obsahu fenolických kyselin a celkových flavonoidů bylo provedeno s využitím HPLC–DAD a HPLC–MS. U hruškové slupky se TP pohyboval v rozmezí od 112,58 do 837,73 mg (GAE)/100 g, v dužině pak od 150 do 420 mg (GAE)/100 g. Celkový obsah flavonoidů se pohyboval od 96,43 do 807,70 mg (RU)/100 g ve slupce, v dužině pak 50,00–150,00 mg (RU)/100 g. Z výsledků je zřejmé, že slupka hrušky má mnohem vyšší obsah fenolických kyselin a flavonoidů než dužina [5].

4.2.6 Hodnocení volné antioxidační a antihemolytické aktivity kdoule obecné (*Cydonia oblonga*): Srovnávací studie se zeleným čajem (*Camellia sinensis*)

Cílem této studie bylo určit fenolický profil a prozkoumat antioxidační potenciál listu kdoule obecné ve srovnání se zeleným čajem. Byly připraveny methanolové extrakty a obsah fenolických látek v kdoulových listech byl stanoven pomocí HPLC/UV. Antioxidační vlastnosti byly hodnoceny metodou FC, DPPH testem a inhibice 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihydrochlorid (AAPH) indukované oxidativní hemolýzy lidských erytrocytů.

Bylo zjištěno, že hlavní fenolickou sloučeninou v extraktu z kdoulových listů je kyselina 5-O-kafeoylchinová (neochlorogenová). Kdoulové listy vykazovaly výrazně vyšší redukční kapacitu než zelený čaj (průměrná hodnota $227,8 \pm 34,9$ a $112,5 \pm 1,5$ g/kg sušiny).

Tyto výsledky ukazují, že kdoulové listy mohou být použity jako preventivní nebo léčebný prostředek u nemocí, u nichž se jedná o působení volných radikálů [6].

5 Souhrn výsledků

V následujících tabulkách jsou shrnuty výsledky stanovení obsahu polyfenolů z vybraných studií podle druhu ovoce a jeho částí. Výsledky byly přepočteny na stejnou jednotku mg/100 g, aby byly mezi sebou lépe porovnatelné.

Tabulka 3 Celkový obsah fenolických látek a flavonoidů u plodu hrušky, dužiny a slupky

Plod		Dužina		Slupka		Citace
TP	TF	TP	TF	TP	TF	
–	–	50–350	160–640	263,60–1 121,50	281,20–1682,70	[4]
–	–	150–420	50–150	112,58–837,73	96,43–807,70	[5]
178,00 ^{fw*}	–	–	–	–	–	[30]

TP: celkový obsah fenolických látek, TF: celkový obsah flavonoidů, – neuvedeno

TP je vyjádřen jako mg (GAE)/100 g sušiny, TF je vyjádřen jako mg (RU)/100 g sušiny

*fw: výsledek je vyjádřen jako mg (GAE)/100 g hmotnosti čerstvého ovoce

Výsledky ukazují, že hrušková slupka obsahuje až několikanásobně vyšší množství fenolických látek a flavonoidů. Studie 4 a 5 využívaly stejnou metodu extrakce, výsledky se tedy nejspíše liší zvolenou odrůdou testovaných hrušek.

Tabulka 4 Obsah polyfenolů v jablečných plodech

Odrůda	Celkový obsah polyfenolů	Citace
–	1 311,77	[11]
M. 'Red splendor'	4 663,00	[14]
M. micromalus Haihongguo	2 081,00	[14]
M. micromalus	446,00	[14]
M. pumila 'Fuji'	406,00	[14]
Green apple	68,29 ^{fw*}	[30]
Red apple	374,00 ^{fw*}	[30]
Golden apple	248,00 ^{fw*}	[30]

Výsledky jsou vyjádřeny jako mg (GAE)/100 g sušiny

*fw: výsledek je vyjádřen jako mg (GAE)/100 g hmotnosti čerstvého ovoce

Obsah polyfenolů záleží mimo jiné na odrůdě, může se tak mezi různými odrůdami až řádově lišit. Nejvyšší množství obsahují odrůdy s červenou barvou slupky jako je odrůda M. Red splendor a Red apple.

Tabulka 5 Obsah polyfenolů v jablečném šrotu

Šrot		Citace
TP	TF	
398,00–578,00	91,00–200,00	[9]
562,6	–	[15]

TP je vyjádřen jako mg (GAE)/100 g sušiny

TF je vyjádřen jako mg (QE)/100 g sušiny

Studie 9 a 15 využívají rozdílnou extrakční metodu, nicméně výsledek je v obou případech podobný. Jablečný šrot může být dobrým zdrojem polyfenolů i přes to, že se jedná spíše o odpadní produkt při zpracovávání jablek.

Tabulka 6 Celkový obsah polyfenolů v jablečných listech

Listy		Citace
TP	TF	
16 335,00	4 502,00	[7]
3 038,00	2 090,00	[10]
9 457,59	–	[11]
5 674,00	3 756,00	[19]

TP je vyjádřen jako mg (GAE)/100 g sušiny

TF je vyjádřen jako mg (QE)/100 g sušiny

Studie 19 uvádí, že vzorky listů byly odebrány po sklizni jablečných plodů, studie 7 uvádí, že listy byly odebrány z deset let starých stromů, ostatní studie podrobnosti o sběru vzorků neuvádějí. Jablečné listy obsahují několikanásobně vyšší množství než plody, nebo jablečný šrot. Mohou tak být vynikajícím alternativním zdrojem polyfenolů. Vykazují také významnou antioxidační aktivitu [10,19].

Tabulka 7 Celkový obsah fenolických látek–kdoule

Plod	Dužina	Slupka	Listy	Citace
–	–	–	3 494,00	[6]
2 609,50	–	–	11 796,72	[11]
–	–	–	490,00–1 650,00	[16]
1 816,60–3 436,60	–	–	–	[21]
–	42,17 ^{*fw}	131,45 ^{*fw}	–	[31]

TP je vyjádřen jako mg/100 g sušiny

*fw: výsledek je vyjádřen jako mg/100 g hmotnosti čerstvého ovoce

Plod kdoule, oproti některým odrůdám jablek (tabulka 4), obsahuje vyšší množství fenolických látek. Jako u všech ostatních druhů ovoce uvedených v této práci, slupka obsahuje vyšší množství fenolických látek než dužina. Pro extrakci polyfenolů z kdoulových listů byly použity různé metody. Listy kdoule obsahují v některých případech více polyfenolů než listy jablek, a podle studie 11 také vykazují vyšší antioxidační aktivitu než listy jablek. Často používaným standardem byla kyselina 5-O-kafeoylchinová.

Tabulka 8 Souhrnná tabulka vybraných studií a použitých metod analýzy polyfenolů

Ovoce, části	Metoda extrakce	Metoda identifikace	Metoda stanovení	Citace
Jablko/kdoule, listy/plody	Methanol : k. askorbová : k. octová	UHPLC–MS–ESI	UHPLC–PDA–FL	[11]
Jablko dužina/slupka	70% Methanol : 2% k. mravenčí	HPLC	TP: FC TF: AlCl ₃	[32]
Jablko dužina/slupka	Methanol : voda	–	TP: FC TF: AlCl ₃ HPLC–PDA	[33]
Jablko, listy	Ethanol	HSCCC, HPLC-MS, NMR	TP: FC 760 nm (GAE) TF: AlCl ₃ 420 nm (QE)	[19]
Jablko, listy	70% Ethanol	RP–HPLC–DAD	TP: FC 735 nm (GAE) TF: AlCl ₃ (QE)	[10]
Jablko, listy	70% Ethanol	HPLC–PDA	TP: FC TF: spektrofotometricky	[7]
Jablko, plody	80% Methanol : 0,1% HCl	–	TP: FC 765 nm (GAE) TF: AlCl ₃ 415 nm (QE)	[34]
Plody, jablko, hruška	QUENCHER	–	UV/VIS spektrofotometrie	[30]
Jablko, plané jablko, plody	Methanol : k. mravenčí : voda 70 : 2 : 28	HPLC–DAD	TP: FC 760 nm (GAE)	[14]
Jablko, šrot	Methanol	HPLC–DAD	TP: FC (GAE) TF: AlCl ₃ 415 nm	[9]
Jablko, šrot	Aceton : voda 70 : 30	HPLC–UV/VIS	HPLC–UV/VIS	[15]
Plody, kdoule, jablko	Aceton	HPLC–MS	TP: FC epikatechin jako standard HPLC–MS	[13]

Ovoce, části	Metoda extrakce	Metoda identifikace	Metoda stanovení	Citace
Kdoule, listy	Methanol	HPLC–DAD	TP: FC HPLC–UV	[6]
Kdoule, listy	Methanol, SPE	HPLC–DAD	HPLC/UV	[16]
Kdoule, dužina, slupka	Aceton : voda	HPLC–DAD–MS/ESI	HPLC–DAD–MS/ESI	[31]
Kdoule, dužina, slupka	Methanol	HPLC–DAD	HPLC–UV	[8]
Kdoule, plod	–	UHPLC–PDA– MSQToF(ESI)	UHPLC–PDA–FL	[21]
Hruška, plod	Methanol : HCl : toluen– α –tihol Methanol : k. octová	HPLC/ESI–MS ²	HPLC–DAD	[20]
Hruška, dužina, slupka	Methanol : voda	HPLC–PDA	TP: FC (GAE) TF: AlCl ₃ 506 nm (RU)	[4]
Hruška, dužina, slupka	Methanol : voda	HPLC–DAD–ESI/MS	TP: FC 765 nm (GAE) TF: AlCl ₃ 510 nm	[5]
Jahoda	Methanol	HPLC–CEAD	HPLC–CEAD	[24]

TP: celkový obsah fenolických látek

TF: celkový obsah flavonoidů

– neuváděno

6 Diskuze

V identifikaci a stanovení polyfenolů v ovoci a jeho částech hraje roli řada faktorů, jako jsou metoda extrakce [19], metoda sušení vzorku ovoce [9, 15] a jeho skladování [15]. Ale vliv má například i doba sběru vzorků.

Z tabulky 8 je patrné, že nejčastější metodou extrakce polyfenolů je extrakce do kapaliny. Často využívané metody extrakce jsou extrakce do 70–80% ethanolu [7, 10, 19] extrakce methanolem [4, 5, 6, 16], směsí methanolu a kyseliny mravenčí [14, 32] a extrakce pomocí acetonu [13, 15, 31]. Vybraná metoda extrakce také závisí na volbě mobilní fáze pro HPLC systém, jsou volena taková rozpouštědla, která jsou se systémem HPLC kompatibilní.

Jako nejúčinnější metoda sušení vzorků ovoce se ukázalo sušení mrazem, které využívají téměř všechny uvedené studie. Méně bylo využíváno sušení horkým vzduchem nebo sušení na slunci [9].

Jak je uvedeno v tabulce 8, pro určení celkového obsahu fenolických látek a flavonoidů byly velice často využívány kolorimetrické metody (metoda FC a metoda s $AlCl_3$), které byly vyhodnocovány metodou kalibrační křivky. Jako kalibrační standard byla pro kvantifikaci fenolických látek používána kyselina gallová, pro kvantifikaci flavonoidů pak kvercetin a rutin. Pouze u analýzy kdoulových listů a jiných částí kdoulí byla jako kalibrační standard zvolena kyselina 5-O-kafeoylchinová. Tyto metody byly ke kvantifikaci využity ve 12 případech z 20 vybraných studií, zřejmě z důvodů snadné proveditelnosti a nízkých nároků na instrumentaci, ale také proto, že dostačovaly pro účel studie. Ostatní studie využívaly ke kvantifikaci HPLC s různými typy detekce, s použitím metody vnějšího standardu a metodu kalibrační křivky.

K identifikaci polyfenolů obsažených v ovoci, bylo použito výhradně HPLC. Pouze v jednom případě bylo k identifikaci purifikovaných látek použito NMR. HPLC s detektory diodového pole mohlo být častou volbou právě díky možnosti porovnání spekter s knihovnou spekter. Dále se k identifikaci polyfenolů využívá HPLC s coulometrickým detektorem, ale v tomto případě je identifikace možná pouze díky porovnání retenčních časů, protože není k dispozici knihovna spekter. Nicméně při analýze malvic nejsou první volbou, ale jak ukazují jiné studie, detekce pomocí CEAD se využívá hlavně k analýze lignanů [24]. Využití HPLC s hmotnostními detektory je pro identifikaci látek výhodné, nebylo ovšem tak často používané, jeho hlavní nevýhodou je cena.

7 Závěr

V této práci byly v první části shromážděny informace o metodách identifikace a kvantifikace obsahových látek v ovoci, vykazujících antioxidační aktivitu. V druhé části pak bylo shrnuto porovnání dvaceti různých studií, které se zabývají identifikací a stanovením polyfenolů v malvicích a jejich částech.

Existuje mnoho metod, které se dají k tomuto účelu použít. K identifikaci i kvantifikaci se často používá separace v HPLC s detektory diodového pole jako vhodným způsobem detekce. Dále se používají detektory coulometrické a hmotnostní. Jako jednoduché kvantitativní metody jsou vhodné spektrofotometrické metody, metoda Folin–Ciocalteou, ke stanovení celkového obsahu fenolických látek, a metoda s AlCl_3 , ke stanovení celkového obsahu flavonoidů. Co se týče obsahu polyfenolů v ovoci a jeho částech, zde hraje roli řada faktorů, nicméně vybrané studie ukazují, že listy stromů často obsahují více polyfenolů než plody a mohou tak být potenciálním zdrojem látek s antioxidačními účinky.

8 Seznam použité literatury

1. M.ABBAS, F.SAEED, F.M. ANJUM, et al. Natural polyphenols: An overview, International Journal of Food Properties 2017, 20:8, 1689–1699, Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10942912.2016.1220393?src=ecsys> [cit. 2.11.2019]
2. A. SCALBERT, C. MANACH, C. MORAND, et al. Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2005, 45:4, 287–306, Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/1040869059096> [cit. 2.11.2019]
3. Product Comparison Guide, <https://www.sigmaaldrich.com>
4. X. LI, T. WANG, B. ZHOU, et al. Chemical composition and antioxidant and anti-inflammatory potential of peels and flesh from 10 different pear varieties (Pyrus spp.), Food Chemistry, 2014, 152, 531–538, Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814613018657> [cit. 7.2.2020]
5. T. WANG, X. LI, B. ZHOU, et al. Anti-diabetic activity in type 2 diabetic mice and α -glucosidase inhibitory, antioxidant and anti-inflammatory potential of chemically profiled pear peel and pulp extracts (Pyrus spp.), Journal of Functional Foods, 2015, 13, 276–288 Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S175646461400440X> [cit. 7.2.2020]
6. R. M. COSTA, A. S.MAGALHÃES, J. A.PEREIRA, et. al, Evaluation of free radical-scavenging and antihemolytic activities of quince (Cydonia oblonga) leaf: A comparative study with green tea (Camellia sinensis), Food and Chemical Toxicology, 2009, 47, 4, 860–865, Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691509000325> [cit. 3.3.2020]

7. M. LIAUDANSKAS, P. VIŠKELIS, R. RAUDONIS, et al. Phenolic Composition and Antioxidant Activity of *Malus domestica* Leaves, *The Scientific World Journal*, 2014, 1–10, Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/tswj/2014/306217/> [cit. 23.3.2020]
8. A. S. MAGALHÃES, B. M. SILVA, J. A. PEREIRA, et al. Protective effect of quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit against oxidative hemolysis of human erythrocytes, *Food and Chemical Toxicology*, 2009, 47, 6, 1372–1377, Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691509001203> [cit. 3.4.2020]
9. S. RANA, S. GUPTA, A. RANA, et al. Functional properties, phenolic constituents and antioxidant potential of industrial apple pomace for utilization as active food ingredient, *Food Science and Human Wellness*, 2015, 4, 4, 180–187, Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213453015000543> [cit. 6.3.2020]
10. S. RANA, S. KUMAR, A. RANA, et al. Phenolic constituents from apple tree leaves and their in vitro biological activity, *Industrial Crops and Products*, 2016, 90, 15, 118–125, Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669016304113#bib0060> [cit. 23.3.2020]
11. M. TELESZKO, A. WOJDYŁO, Comparison of phenolic compounds and antioxidant potential between selected edible fruits and their leaves, *Journal of Functional Foods*, 2015, 14, 736–746, Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464615001036> [cit. 4.2.2020]
12. M. DOUŠA, Vliv složení mobilní fáze na retenci solutů, *HPLC.CZ*, Dostupné z: <http://www.hplc.cz> [cit. 14.4.2020]
13. Y. HAMAUZU, T. INNO, CH. KUME, et al. Antioxidant and Antiulcerative Properties of Phenolics from Chinese Quince, Quince, and Apple Fruits, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54, 3, 765–772, Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/jf052236y#> [cit. 6.3.2020]

14. M. HAN, G. LI, X. LIU, et al. Phenolic Profile, Antioxidant Activity and Anti-proliferative Activity of Crabapple Fruits, Horticultural Plant Journal, 2019, 5, 4, 155–163, Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468014119300214#tbl0001> [cit. 6.3.2020]
15. V. LAVELLI, S. CORTI, Phloridzin and other phytochemicals in apple pomace: Stability evaluation upon dehydration and storage of dried product, 2015, 129, 4, 1578–1583 Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814611008764> [cit. 6.3.2020]
16. A. P. OLIVEIRA, J. A. PEREIRA, P. B. ANDRADE, et al. Phenolic Profile of Cydonia oblonga Miller Leaves, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55, 19, 7926–7930, Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/jf0711237#> [cit. 6.3.2020]
17. M. DOUŠA, Typy detektorů v HPLC, HPLC.CZ, Dostupné z: <http://www.hplc.cz> [cit. 24.2.2020]
18. J. J. PITT, Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry, Clinical Biochemist Reviews, 2009, 30, 1, 19–34, Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2643089/> [cit. 14.4.2020]
19. Y. LU, Y. DU, X. QIN, et al. Comprehensive evaluation of effective polyphenols in apple leaves and their combinatory antioxidant and neuroprotective activities, Industrial Crops and Products, 2018, 129, 242–252, Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669018310653> [cit. 4.11.2019]
20. M. BRAHEM, C. M. G. C. RENARD, S. EDER, et al. Characterization and quantification of fruit phenolic compounds of European and Tunisian pear cultivars, Food Research International, 2017, 95, 125–133 Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096399691730090X> [cit. 5.4.2020]

21. A. WOJDYŁO, J. OSZMIANŃSKI, P. BIELICKI, Polyphenolic Composition, Antioxidant Activity, and Polyphenol Oxidase (PPO) Activity of Quince (*Cydonia oblonga* Miller) Varieties, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61, 11, 2762–2772, Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/jf304969b> [cit. 6.3.2020]
22. G. SONTAG, M. I. PINTO, J. P. NORONHA, et al. Analysis of Food by High Performance Liquid Chromatography Coupled with Coulometric Detection and Related Techniques: A Review, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67, 15, 4113–4144, Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acs.jafc.9b00003> [cit. 24.2.2020]
23. J. L. PEÑALVO, T. NURMI, Application of coulometric electrode array detection to the analysis of isoflavonoids and lignans, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, 41, 5, 1497–1507, Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708506002688> [cit. 24.2.2020]
24. H. SCHWARTZ, G. SONTAG, Determination of secoisolariciresinol, lariciresinol and isolariciresinol in plant foods by high performance liquid chromatography coupled with coulometric electrode array detection, *Journal of Chromatography B*, 838, 2, 11, 2006, 78–85
Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023206002947#bib8> [cit. 3.4.2020]
25. V. GÖKMEN, A. SERPEN, V. FOGLIANO, Direct measurement of the total antioxidant capacity of foods: the ‘QUENCHER’ approach, *Trends in Food Science & Technology*, 2009, 20, 278–288, Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224409001289#bib47> [cit. 5.2.2020]
26. M. R. ROVER, R. C. BROWN, Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin–Ciocalteu method, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 2013, 104, 366–371, Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165237013001411#bib0080> [cit. 8.2.2020]

27. [www.sigmaaldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Datasheet/6/47641dat.pdf), Folin–Ciocalteu’s phenol reagent, Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Datasheet/6/47641dat.pdf> [cit. 27.2.2020]
28. L. A. L. DA SILVA, B. R. PEZZINI, L. SOARES, Spectrophotometric determination of the total flavonoid content in *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae) leaves, *Pharmacognosy Magazine*, 2015, 11, 41, 96–101, Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4329640/> [cit. 27.2.2020]
29. A. PEKAL, K. PYRZYNSKA, Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay, *Food Analytical Methods*, 2014, 7, 1776–1782, Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12161-014-9814-x> [cit. 27.2.2020]
30. E. D. CÖMERT, B. A. MOGOL, V. GÖKMEN, Relationship between color and antioxidant capacity of fruits and vegetables, *Current Research in Food Science*, 2020, 2, 1–10, Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2665927119300097> [cit. 5.2.2020]
31. S. FATTOUCH, P. CABONI, V. CORONEO, et al. Antimicrobial Activity of Tunisian Quince (*Cydonia oblonga* Miller) Pulp and Peel Polyphenolic Extracts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55, 3, 963–969, Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/jf062614e#> [cit. 6.3.2020]
32. X. WANG, C. LI, D. LIANG , et al. Phenolic compounds and antioxidant activity in red-fleshed apples, *Journal of Functional Foods*, 2015, 18, B, 1086–1094 Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464614002047> [cit.3.4.2020]
33. N. R. MIHAILOVIĆ, V. B. MIHAILOVIĆ, SAMOKREFT, et al. Analysis of phenolics in the peel and pulp of wild apples (*Malus sylvestris* (L.) Mill.), *Journal of Food Composition and Analysis*, 2018, 67, 1–9, Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889157517302788#bib0005> [cit. 14.4.2020]

34. A. BAHUKHANDI, P. DHYANI, I. D. BHATT, et al. Variation in Polyphenolics and Antioxidant Activity of Traditional Apple Cultivars from West Himalaya Uttarakhand, Horticultural Plant Journal, 2018, 4, 4, 151–157, Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468014118301444>
[cit.3.4.2020]