

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie



**Sledování profilu fenolických látek v různých částech
jabloní pomocí HPLC**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Anežka Adamcová

HRADEC KRÁLOVÉ, 2021

Bc. Kristýna Šilhavá

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucímu diplomové práce doc. RNDr. Daliboru Šatínskému, Ph.D. za jeho ochotu, milé jednání, a že jsem měla možnost účastnit se projektu podporovaném TAČR TJ02000196 a GAUK 1152120. Dále bych chtěla velmi poděkovat mé konzultantce Mgr. Anežce Adamcové za pomoc během praktické části při zpracování a analýze vzorků, za rady, nápady, trpělivost a čas, které mi poskytla. Děkuji také katedře analytické chemie za poskytnutí pomůcek a přístrojů pro měření.

Poděkování patří i mé rodině, která mě po celou dobu studia podporovala a povzbuzovala.

Prohlášení

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

V Hradci Králové

Podpis

Dne

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Bc. Kristýna Šilhavá

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Anežka Adamcová

Název: Sledování profilu fenolických látek v různých částech jabloní pomocí HPLC

V této diplomové práci byla provedena kvantitativní analýza fenolických sloučenin v deseti různých odrůdách jabloní. Konkrétně bylo sledováno zastoupení floridzinu, floretinu, rutinu, kvercitrinu a kyseliny chlorogenové. U každé odrůdy byly analyzovány extrakty pupenů, květů, listů a kůry ve čtyřech různých vegetačních obdobích. Dále se sledovalo zastoupení fenolických látek ve vzorcích štěpky. Stanovované analyty vykazovaly různý obsahový profil v závislosti na zkoumaném materiálu, odrůdě jablek a období, ve kterém byl proveden jejich odběr. Dominantní složku ve všech odrůdách a ve všech materiálech tvořil floridzin. Nejvyšší celkový obsah fenolických látek v odpadních produktech jabloní byl naměřen v listech v jarním období březen-duben 2020 v odrůdě 'Rubinstep'.

Diplomová práce se zabývá aplikací vyvinuté a validované HPLC-DAD metody na velkém množství extraktů. Pro separaci jednotlivých analytů byla zvolena kolona YMC-Triart C18 ExRS (150 × 4,6 mm × 5 μm, 8 nm). Byla využita gradientová eluce a mobilní fáze byla tvořena organickou složkou acetonitrilem a vodnou složkou s kyselinou fosforečnou. Detekce byla provedena pomocí DAD detektoru při vlnových délkách 280 nm, 327 nm a 354 nm. Teplota kolonového prostoru byla nastavena na 30 °C, nástřik byl 1 μl a průtoková rychlost 1 ml/min.

Teoretická část zahrnuje studie zabývající se farmakologickým účinkem floridzinu na různá chronická onemocnění a jsou zde uvedeny dostupné doplňky stravy obsahující floridzin a příbuzné látky.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Bc. Kristýna Šilhavá

Supervisor: doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Consultant: Mgr. Anežka Adamcová

Title of Diploma Thesis: Monitoring the profile of phenolic substances in different parts of apple trees by HPLC

This diploma thesis covers the performance of a quantitative analysis of phenolic compounds in ten different cultivars in *Malus*. Specifically, the presence of phloridzin, phloretin, rutin, quercitrin and chlorogenic acid was monitored. Extracts of buds, flowers, leaves and bark in each species were analyzed during the four different vegetation periods. Further, the presence of phenolic compounds in samples of wood chips and fruits was monitored. The determined analytes displayed a different content profile depending on the plant material, apple cultivar and the period in which they were collected. Except for fruits, phloridzin was the dominant component in all varieties and in all materials. The highest total concentration of phenolic compounds was found in the leaves in the spring March-April 2020 in species 'Rubinstep'.

This diploma thesis used a developed and validated HPLC-DAD method for a large number of extracts. A YMC-Triart C18 ExRS column (150 × 4.6 mm × 5 μm, 8 nm) was chosen to separate the individual analytes. The gradient elution was used. The mobile phase consisted of the organic part of acetonitrile and the water part consisted of the phosphoric acid. The detection was performed using a DAD detector at wavelengths 280 nm, 327 nm and 354 nm. The temperature of the column oven was 30 °C, injection volume was 1 μl and flow rate of mobile phase was 1 ml/min.

The theoretical part includes studies of the pharmacological effect of phlorizin on various chronic diseases. Dietary supplements with a beneficial effect based on phloridzin and other compounds are mentioned.

Obsah

1	Seznam použitých zkratk	9
2	Úvod	10
3	Zadání a cíl práce	11
4	Teoretická část	12
4.1	Fenolické látky	12
4.2	Fenolické látky v jabloni	13
4.3	Stanovované fenolické látky a jejich vlastnosti	13
4.3.1	Floridzin	13
4.3.2	Floretin	17
4.3.3	Rutin	18
4.3.4	Kvercitrin	20
4.3.5	Kyselina chlorogenová	21
4.4	Doplňky stravy s obsahem floridzinu a dalších stanovovaných látek	21
4.4.1	Doplňky stravy obsahující floridzin a floretin	22
4.4.2	Doplňky stravy s ostatními fenolickými látkami	24
4.5	Stanovení a extrakce fenolických látek	24
4.6	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	25
4.7	Kolony	26
4.7.1	Údržba kolon	26
4.7.2	Kolona YMC-TRIART	27
4.8	Příklady stanovení fenolických látek v jabloních v předchozích studiích	29
5	Experimentální část	31
5.1	Pomůcky	31
5.1.1	Přístroje, laboratorní nádobí a další	31
5.2	Materiál	31
5.2.1	Použitý rostlinný materiál	31

5.3	Použité chemikálie	32
5.3.1	Standardy	32
5.3.2	Rozpouštědla.....	32
5.4	Příprava vzorků	32
5.5	Příprava roztoků	33
5.5.1	Extrakční roztok.....	33
5.5.2	Zásobní roztoky standardů.....	33
5.5.3	Směsný roztok standardů	33
5.5.4	Příprava mobilní fáze.....	33
5.6	Podmínky analýzy	33
5.6.1	Příklad chromatogramu směsi standardů.....	35
5.6.2	Příklad chromatogramu reálného extraktu.....	35
5.6.3	Průměrné hodnoty retenčních časů jednotlivých standardů	36
5.6.4	Výpočet koncentrace fenolických látek.....	36
6	Výsledky.....	37
6.1	Obsah fenolických látek v jednotlivých odrůdách.....	37
6.1.1	'Topaz'	37
6.1.2	'Golden Delicious'	39
6.1.3	'Angold'	40
6.1.4	'Meteor'	42
6.1.5	'Melrose'	43
6.1.6	'Fuji'	45
6.1.7	'Braeburn'	46
6.1.8	'Lady Silvia'	48
6.1.9	'Rubinstep'	49
6.1.10	'Rubin'	51
6.2	Celková antioxidační aktivita.....	52

6.3	Zastoupení fenolických látek v jednotlivých odrůdách	54
6.3.1	Floridzin.....	54
6.3.2	Floretin.....	55
6.3.3	Kyselina chlorogenová	57
6.3.4	Rutin.....	58
6.3.5	Kvercitrin.....	60
6.4	Obsah fenolických látek ve starých odrůdách.....	61
6.5	Obsah fenolických látek ve vzorku štěpky.....	62
6.6	Celkové zhodnocení	62
7	Závěr a diskuse	64
8	Seznam tabulek.....	66
9	Seznam obrázků.....	67
10	Seznam grafů	68
11	Použitá literatura	69

1 Seznam použitých zkratek

ACN	acetonitril
DAD	detektor s diodovým polem
DM	diabetes mellitus
FIA	průtoková injekční analýza
GLUT	glukózový transportér
HDL	lipoprotein s vysokou denzitou
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
CHOL	cholesterol
IFN	interferon
IL	interleukin
LDL	lipoprotein s nízkou denzitou
MetOH	methanol
MF	mobilní fáze
SF	stacionární fáze
SIC	sekvenční injekční chromatografie
SGLT	sodíkovo-glukózový transportér
TAA	celková antioxidační aktivita
TAG	triacylglyceroly
TNF	tumor nekrotizující faktor
UV	ultrafialové záření
VIS	viditelné záření

2 Úvod

Jabloně jsou významné a v České republice nejvíce rozšířené ovocné stromy z čeledi růžovitých. Dorůstají do výšky až 15 metrů a dožívají se i více než 100 let. Z posledního šetření Českého statistického úřadu (ČSÚ) z roku 2017 jsou pěstované na celkové ploše 7 819 ha (47,6 %) s průměrnou hustotou 1 322 jabloní na hektar [1]. Jak vyplývá z této diplomové práce, každý strom představuje doposud nevyužívaný zemědělský a hojně se vyskytující materiál s potenciálním využitím.

Jablka obsahují vitamíny, β -karoten, minerály, základní stopové prvky, polyfenolické sloučeniny, vlákninu a další biologicky aktivní sloučeniny [2]. Chemické složení jablek a účinky na zdraví již byly důkladně zkoumány v několika vědeckých publikacích. Bohužel ne stejné publicitě se těší vědecké publikace, které se zabývají zkoumáním chemického složení a biologického a farmaceutického využití nejedlých částí jabloní jako jsou listy, kůra, pupeny nebo květy.

Na rozdíl od plodů akumulují jablečné listy vysoké množství floridzinu a v listech tvoří majoritní fenolickou sloučeninu. Vzhledem k vysoké koncentraci fenolických látek v těchto odpadních produktech a jejich prospěšným účinkům na organismus by bylo vhodné tento materiál uplatnit pro další lékařské, potravinářské, kosmetické, farmaceutické a vědecké účely [3].

Ke stanovení fenolických látek v rostlinných matricích se nejčastěji využívá vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s různými způsoby detekce [4]. HPLC metoda byla použita i v této diplomové práci pro sledování profilu fenolických látek ve vybraných odrůdách jablek a odpadního materiálu z jabloní.

3 Zadání a cíl práce

Zadáním této diplomové práce bylo stanovení hlavních fenolických látek (floridzinu, floretinu, rutinu, kvercitrinu a kyseliny chlorogenové) v biomase jabloní (pupeny, květy, listí, kůra, štěpka) pomocí vyvinuté a validované HPLC-DAD metody. Porovnání fenolického profilu proběhlo u 10 odrůd: 'Topaz', 'Golden Delicious', 'Angold', 'Meteor', 'Melrose', 'Fuji', 'Braeburn', 'Lady Silvia', 'Rubinstep' a 'Rubin' v obdobích březen-duben, červen, srpen a listopad 2020. Cílem je určit typ materiálu, odrůdu a období s nejvyšším množstvím fenolických látek.

Teoretická část se s využitím nejnovějších vědeckých studií zabývá základní charakteristikou stanovovaných fenolických látek, jejich využitím ve farmaceutickém průmyslu a možnostmi stanovení fenolů, především floridzinu.

4 Teoretická část

4.1 Fenolické látky

Fenolické látky jsou sloučeniny, které tvoří velmi rozšířenou skupinu látek. V současné době je známo více než 8 tisíc fenolických sloučenin. Jedná se o sekundární metabolity rostlin, které jsou syntetizovány pomocí šikimátové a fenylypropanoidové cesty. Fenolické látky jsou tvořeny jedním nebo více aromatickými kruhy s různým počtem hydroxylových skupin. Tvoří podstatnou součást rostlinné potravy. Ovoce a zelenina obsahující tyto složky přispívá k udržení lidského zdraví a prevenci chronických onemocnění jako je obezita, cukrovka či kardiovaskulárních onemocnění [5]. Přítomnost těchto sloučenin ve stravě ovlivňuje funkci plic, zdraví kostí, regulaci hmotnosti, snižuje riziko koronárních onemocnění a chrání před neurodegenerací. Tyto látky hrají také významnou roli u samotných rostlin, kde mají vliv na jejich růst a reprodukci, poskytují ochranu před škůdci a patogeny. Bylo zjištěno, že po napadení jabloní patogenními bakteriemi nebo houbami došlo ke změnám v obsahu fenolických látek, zejména u floridzinu a floretinu [6]. Přispívají také k barevným a sensorickým vlastnostem rostlinných druhů, dodávají charakteristické zbarvení, chuť a vůni. V případě enzymatických reakcí katalyzovaných polyfenoloxidázou může docházet k nežádoucímu hnědnutí a ztrátě chuti a živin v ovoci i zelenině [7]. Většina fenolických látek má antioxidační aktivitu, která vede k protizánětlivým, antitrombotickým, antiaterogenním, neuroprotektivním, protinádorovým, antidiabetickým a kardioprotektivním účinkům. V alternativním léčení se přírodní polyfenoly využívají ve formě extraktů k léčbě onemocnění zažívacího, cévního, vylučovacího či dýchacího ústrojí, v dermatologii a při protinádorové terapii. Mnoho fenolických sloučenin v potravinách má inhibiční účinky na mutagenezi a karcinogenezi [8]. Pozorovány byly také pozitivní účinky fenolických látek na atrofii kosterního svalstva, kde docházelo k prevenci úbytku svalové hmoty [9]. Účinky těchto sloučenin závisí na jejich denním příjmu množství a jejich biologické dostupnosti. Biologická dostupnost také závisí na několika faktorech. Prvním je struktura a složení fenolických látek, dále technologické zpracování potravin, další faktor souvisí konkrétně s člověkem a jeho zdravotním stavem, aktivitou enzymů a pohlavím, posledním faktorem je dostupnost potravin [10]. Kromě potravinových výrobků se fenolické látky využívají

k výrobě kosmetických přípravků a doplňků stravy. Například floretin a arbutin se využívají jako přírodní bělicí prostředky pokožky [6, 82].

4.2 Fenolické látky v jabloni

Jablka jsou bohatým zdrojem fenolických látek. Hlavními fenolickými látkami jsou kvercetin a jeho glykosidy, katechin, epikatechin, kyselina chlorogenová, kvercitrin, floridzin a jeho deriváty [11]. Kvantitativní a kvalitativní profil fenolických látek v jablcích se liší v závislosti na jejich odrůdě, zemi pěstování či jejich ošetřování [12]. Také zralost plodů může významně ovlivnit chemické složení, obsah fenolických látek a jejich antioxidační aktivitu [10, 13].

Fenolické látky jsou bohatě zastoupené i v rostlinných orgánech. Stejně jako u plodů se u těchto rostlinných částí liší jak kvalitativní, tak kvantitativní profil fenolických látek u různých odrůd a různorodé je i jejich uplatnění v léčitelství. V jablečných listech je největší zastoupení floridzinu [85]. Podle studie Yildirim a kol. (2017) je v květech nejvíce zastoupená kyselina chlorogenová. V naší studii byl majoritní fenolickou látkou floridzin, který ve zmíněné studii v květech stanovován nebyl. Dalšími významnými sloučeninami v květech jsou například: apigenin, kvercetin, kyselina kofeinová, kyselina p-kumarová, a kyselina gallová [14].

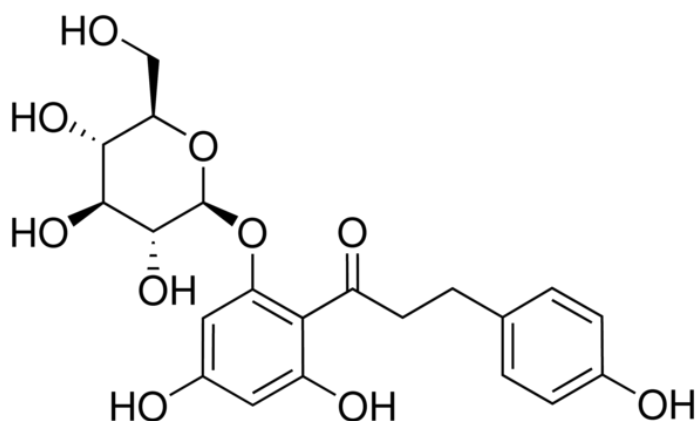
Složení starých odrůd v porovnání s novými není jednoznačné. Příkladem je výzkum, kde kůra a šťáva ze staré španělské odrůdy 'Verde Doncella' měla nižší obsah fenolických látek ve srovnání se současnou odrůdou 'Red Delicious' [19]. Jiná studie však potvrdila vyšší výskyt fenolických látek u starých odrůd oproti 'Golden Delicious' či 'Granny Smith' [15]. V této diplomové práci bylo analyzováno množství fenolických látek ve třech starých odrůdách. Ukázalo se, že odrůda 'Šampaňská reneta' obsahovala až na jednu výjimku více fenolických sloučenin než ostatní novější odrůdy.

4.3 Stanovované fenolické látky a jejich vlastnosti

4.3.1 Floridzin

Molekulový vzorec: $C_{21}H_{24}O_{10}$ [16]

Strukturní vzorec:



Obrázek 1: Strukturální vzorec floridzinu [17]

Glykosid floridzin, označovaný také jako floretin-2'-p-D-glukopyranosid, je přírodní fenolická látka, která se řadí mezi dihydrochalkony. Floridzin je tvořený z floretinu tak, že při syntéze dojde k navázání glukózové skupiny na floretin (floretin je aglykon floridzinu) [18]. Floridzin byl poprvé izolován z kůry jabloní [19]. Je hojně zastoupený v různých rostlinách z čeledi *Rosaceae* a *Ericaceae* [20], nejvyšší koncentrace se však nachází v prvotních stádiích vegetačního období v listech či kůře jabloní [21], jak dokazuje i tato diplomová práce. V plodech je koncentrace floridzinu o poznání menší, nejnižší koncentrace se nachází v dužině, semena a jablečná slupka mají o něco bohatší zastoupení [22]. Jeho množství se zdatně mění v závislosti na ročním období, typu materiálu a v jednotlivých odrůdách.

Vlastnosti floridzinu

Floridzin je při pokojové teplotě stálá bílá až žlutá krystalická látka pevného skupenství, hořké chuti. Přispívá k charakteristické vůni jablečného moštu. Je špatně rozpustný v etheru a teplé vodě. Floridzin je relativně stabilní sloučeninou. Jeho teplota tání je 110 °C a rozkládá se při teplotě nad 200 °C [23]. Floridzin je tvořen dvěma benzenovými jádry s navázanými hydroxylovými skupinami. Mezi sebou jsou jádra spojena tří uhlíkatým řetězcem, na kterém je dvojná vazba s navázaným kyslíkem (Obrázek 1).

Floridzinem proti obezitě

Obezita je celosvětovým zdravotním problémem u dospělých i dětí a úzce s ní souvisí metabolické poruchy jako inzulinová rezistence, cukrovka, hypertenze, zánět nebo dyslipidémie. Ve studiích se vědci zabývali zkoumáním stravy obohacené o floridzin na obezitu většinou u myší.

V jedné studii byl zkoumán účinek floridzinu u obézních myší, kde byli samci rozděleni do tří skupin a po dobu 16 týdnů jim byla podávána příslušná strava. První skupina dostávala normální stravu s 5 % tuku, druhá skupina dostávala stravu s vysokým obsahem tuku (20 %) a třetí skupině se podávala strava bohatá na tuky s přidáním floridzinem. Měřily se hodnoty celkového CHOL, TAG, HDL, LDL, volné mastné kyseliny, hladiny inzulínu a glukagonu, leptinu, adiposinu, TNF, IFN a IL. Výsledkem bylo významné snížení viscerálního tuku a celkové hmotnosti bílé tukové tkáně. Dále došlo ke snížení hladiny prozánětlivých adipokinů, TNF- α , interferonu a IL-6 [63].

Výsledky studií naznačují, že floridzin může být prospěšný pro prevenci obezity, steatózy jater, zánětu, inzulínové rezistence a jiných komplikací [24, 25, 26, 60].

Floridzinem proti diabetu typu 2

Diabetes mellitus (DM) je chronické metabolické onemocnění charakterizované neschopností zpracovávat glukózu. Toto onemocnění je obvykle spojené s dalšími komplikacemi jako je obezita, hypertenze, metabolický syndrom či různá kardiovaskulární onemocnění. Při tomto onemocnění dochází k dysfunkci β -buněk pankreatu, které mají za úkol vylučovat inzulín, který snižuje hladinu glukózy v krvi. Velký vliv na prevenci a léčbu mají nutriční faktory. Konzumace ovoce, zejména ovoce bohaté na fenolické látky, je spojené s nižším rizikem výskytu DM u populace [27]. Bylo provedeno velké množství studií [28, 29, 60], které se zabývaly příznivým účinkem floridzinu na DM. Hlavním biologickým účinkem floridzinu je kompetitivní inhibice absorpce glukózy ve střevě a resorpce glukózy ledvinami prostřednictvím transportérů glukózy SGLT1 a SGLT2 v proximálních tubulech ledvin, čímž dochází ke snížení hladiny glukózy v plazmě. Dále byl pozorován příznivý účinek floridzinu při prevenci proteinurie, hypertenze, hyperfiltrace a hypertrofie ledvin u myší s vyvolaným onemocněním [23].

Floridzinem proti osteoporóze

Osteoporóza je chronické onemocnění kostí, které se projevuje redukcí kostní tkáně a zvýšeným rizikem zlomenin. Dochází při ní k nerovnováze mezi novotvorbou a úbytkem kostní hmoty. Hlavní příčinou a rizikovými faktory tohoto onemocnění jsou nedostatečný příjem vápníku z potravy, nedostatek vitamínu D, věk a pohlaví (ohrožené jsou hlavně ženy) [30]. Vzhledem k tomu, že řada léků vykazovala nežádoucí účinky, bylo nutné hledat alternativní cestu k terapii tohoto onemocnění. Výzkumy [31, 32]

popisují příznivé účinky polyfenolických látek na zdraví kostí. Tyto látky stimulují tvorbu kostí a brání úbytku kostní hmoty. Byly také pozorovány účinky floretinu na postmenopauzální osteoporózu způsobenou nedostatkem estrogenu zpomalením aktivace osteoklastů. Osteoklasty odbourávají kostní tkáň [30].

Další účinky floridzinu

FARMAKOLOGICKÉ ÚČINKY FLORIDZINU

Ochrana jater

- Pomáhá léčit poškozená játra a snižuje riziko dalšího poškození způsobené chemickými látkami
- Zmírňuje steatózu a fibrózu jater

Ochrana proti rakovině

- Zpomaluje růst rakovinových buněk
- Působí preventivně proti rakovině kůže, prsu, tlustého střeva a plic

Ochrana srdce

- Prevence proti ateroskleróze, ICHS a dalším kardiovaskulárním onemocněním
- Prevence hypertenze

Redukce cholesterolu

- Regulace metabolismu lipidů
- Pomáhá zvýšit hladiny HDL a snížit celkový cholesterol

Zpomalení stárnutí a antioxidační účinky

- Podporuje zdraví buněk kůže, podporuje růst vlasů
- Působí proti volným radikálům

Antimikrobiální aktivita

- Příznivé účinky proti bakteriálním kmenům *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* a *Candida glabrata*

Protizánětlivé účinky

- Potlačení zánětlivé reakce
- Snížení exprese prozánětlivých cytokinů

Neuroprotektivní ochrana, zlepšení paměti

Imunomodulační a radioprotektivní účinky

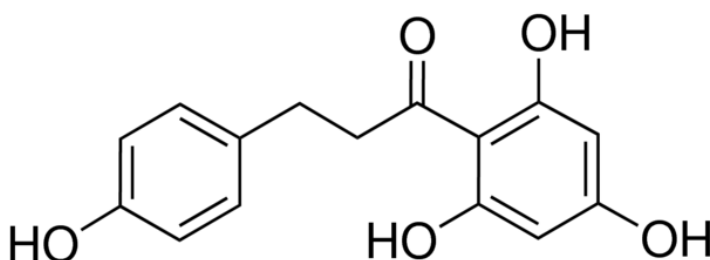
Tabulka 1: Farmakologické účinky floridzinu [23]

Floridzin byl ve svých počátcích nejčastěji používán při léčbě horečky, infekčních chorob a proti malárii. Následovaly další výzkumy, díky kterým se floridzin zařadil na seznam potenciálních léčivých přípravků, například proti zmíněnému DM, z důvodů inhibiční aktivity na SGLT1 a SGLT2. Uvádí se však, že má i určitá omezení jako je špatná absorpce ve střevě či nízká biologická dostupnost. V tenkém střevě savců se nachází enzym laktáza-floridzinhydroláza, který se podílí na přeměně floridzinu na floretin a v důsledku toho se poté do krve dostává menší množství původně přijaté látky. Další studie naznačují možné využití v kosmetickém či potravinářském průmyslu jako konzervační a přídatné látky [23].

4.3.2 Floretin

Molekulový vzorec: $C_{15}H_{14}O_5$ [33]

Strukturní vzorec:



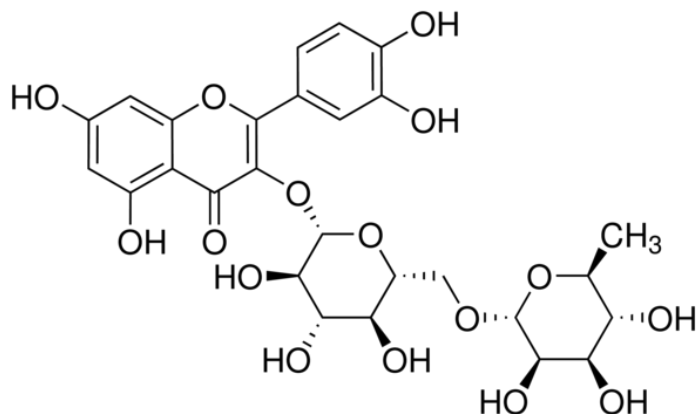
Obrázek 2: Strukturní vzorec floretinu [17]

Floretin, aglykon floridzinu, je přírodní fenolická sloučenina, která patří do skupiny dihydrochalconů. Floretin je sloučenina se spoustou pozitivních biologických účinků jako například antioxidační, antibakteriální, protizánětlivé, antikarcinogenní, hepatoprotektivní či antivirové účinky, které zabraňují navázání a replikaci virů. Floretin má také schopnost zvýšit fluiditu biologických membrán a tím zvýšit penetraci podávaných léků [34, 35].

4.3.3 Rutin

Molekulový vzorec: $C_{27}H_{30}O_{16}$ [36]

Strukturní vzorec:



Obrázek 3: Strukturní vzorec rutinu [17]

Rutin, známý také jako rutosid či vitamín P, se řadí mezi flavonoly [37], což jsou látky, které se vyskytují v rostlinách (hlavně v listech, květech, kůře a slupce) jako barevné pigmenty [38]. Rutin je glykosid, který vzniká spojením rutinózy a kvercetinu [36]. Je to významný antioxidant s řadou farmakologických účinků, využívá se při léčbě různých chronických onemocnění jako například diabetes, rakoviny nebo hypertenze, pomáhá zlepšovat elasticitu cév a snižuje fragilitu kapilár [39]. Jeho nevýhodami jsou omezená biologická dostupnost z důvodu jeho nízké rozpustnosti ve vodě a špatné stability [40]. V tabulce jsou stručně shrnuty jeho farmakologické účinky.

FARMAKOLOGICKÉ ÚČINKY RUTINU

Centrální nervová soustava

- Neuroprotektivní účinek na ischemii mozku
- Antidepresivní účinky
- Léčba hyperkinetické pohybové poruchy

Endokrinní systém

- Antidiabetické účinky
- Antihypercholesterolemické účinky
- Podpora absorpce jodidu štítnou žlázou

Kardiovaskulární systém

- Antihypertenzní účinek
- Kardioprotektivní účinek

Gastrointestinální systém

- Proti žaludečním vředům

Dýchací systém

- Antiastmatická aktivita

Reprodukční systém

- Vliv na kvalitu spermií a mužské reprodukční orgány

Další

- Protinádorové, antibakteriální, antivirové, antiretrovirové, antimalarické a antifungální
- Při atopické dermatitidě, proti únavě, hojení ran, imunitní účinky
- Hepatoprotektivní a nefropotektivní aktivita
- Analgetické a antiartritické účinky, antiosteoporotické účinky

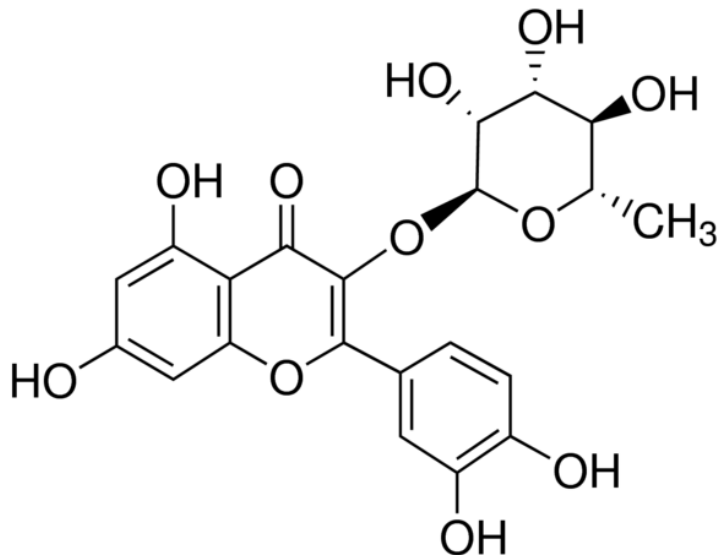
Tabulka 2: Farmakologické účinky rutinu [37, 41]

Rutin je často využíván v kosmetickém, chemickém či farmaceutickém průmyslu, kde je složkou doplňků stravy často v kombinaci s vitamínem C. Flavonoidy mají také fotoprotektivní charakter, výzkum například popisuje potenciální využití rutinu v opalovacích krémech [42], dále například ve formě barviv, konzervačních látek nebo stabilizátorů jako součást potravinového průmyslu [84]. V jedné studii byl zkoumán potenciální účinek rutinu na inhibici důležitých proteinů SARS-CoV-2. Studie tohoto typu by mohly být odrazovým můstkem pro vývoj nových terapeutik pro léčbu onemocnění COVID-19 [43].

4.3.4 Kvercitrin

Molekulový vzorec: $C_{21}H_{20}O_{11}$ [44]

Strukturní vzorec:



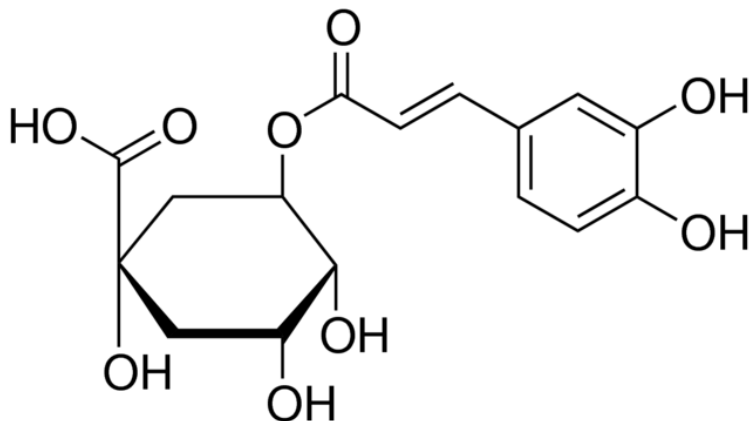
Obrázek 4: Strukturní vzorec kvercitrinu [17]

Kvercitrin je přírodní flavonoid žluté barvy, který se běžně vyskytuje v květinách, listech a plodech různých rostlin [45]. Získává se často z kůry různých druhů dubů [46]. Jedná se o glykosid hořké chuti, jehož hydrolyzou vzniká další rozšířená fenolická látka kvercetin. Kvercitrin je tvořený dvěma benzenovými kruhy a velkým množstvím hydroxylových skupin (Obrázek 6), díky kterým je vysoce polární. V kombinaci s jinými flavonoidy vykazuje antibakteriální, protizánětlivé a antioxidační účinky [47]. Kvercitrin má dále pozitivní účinky na růst vlasů tím, že stimuluje energetický metabolismus v mitochondriích a pomáhá zvyšovat produkci růstových faktorů, které jsou nezbytné pro růst vlasů [48]. Kvercitrin také vykazuje biologické účinky na kosti a gingivální buňky. Ve studii byl hodnocen vliv titanových implantátů kovalentně potažených kvercitrinem na aktivitu osteoklastů. U některých pacientů s různými periodontálními onemocněními, se zhoršeným hojením kostí, u starší populace trpící cukrovkou, osteoporózou či jinými potížemi dochází k nepřijetí zubních implantátů. Takto potažené implantáty nevykazovaly žádné cytotoxické účinky a mohly by být využívány v praxi právě pro pacienty s potížemi přijmout klasický zubní implantát [49].

4.3.5 Kyselina chlorogenová

Molekulový vzorec: $C_{16}H_{18}O_9$ [50]

Strukturní vzorec:



Obrázek 5: Strukturní vzorec kyseliny chlorogenové [17]

Kyselina chlorogenová je přírodní antioxidant, který se nachází v různých druzích kávových zrn včetně kávy zelené [51]. Vyskytuje se také v ovoci a zelenině jako jsou jablka, hrušky, mrkev, rajčata a brambory [52]. U většiny látek se zkoumají pozitivní biologické a farmakologické účinky na lidský organismus. V jedné studii byl pozorován antioxidační účinek kyseliny chlorogenové proti oxidačnímu stresu přímo v rostlinách, konkrétně v listech jabloní. Kyselina chlorogenová tvoří ochranu proti houbám a dalším patogenům, podílí se na odolnosti vůči hmyzu a brání enzymatickému hnědnutí ovoce a zeleniny [53]. Mezi významné pozitivní účinky kyseliny chlorogenové na zdraví člověka patří například účinky: antibakteriální, antivirové, antipyretické, protizánětlivé, hepato a kardioprotektivní, neuroprotektivní, antihypertenzní či antidiabetické. Tato fenolická látka může hrát roli v metabolismu lipidů a glukózy a tím být prospěšná pro léčbu různých patologií, například kardiovaskulárních onemocnění, cukrovky či obezity [54].

4.4 Doplnky stravy s obsahem floridzinu a dalších stanovovaných látek

Fenolické látky jsou častými složkami různých doplňků stravy (nutraceutik). Na rozdíl od léčivých přípravků jsou definovány jako potraviny, které slouží k doplnění běžné stravy za účelem příznivého ovlivnění zdraví. Vyznačují se vysokým podílem

izolovaných minerálních látek, vitamínů, antioxidantů a jiných prospěšných látek [55]. Existují v tekutých nebo sypkých formách jako například kapsle, tablety, pilulky, ampule [56]. Doplnky stravy podléhají zákonu o potravinách a platí pro ně vyhláška č. 58/20018 Sb. (Vyhláška o doplňcích stravy a složení potravin) [55]. Doplnky lze zakoupit v lékárnách, obchodech s potravinami, drogeriích či na internetu [56].

4.4.1 Doplnky stravy obsahující floridzin a floretin

Celkově není výrobků s obsahem těchto fenolických látek na trhu dostupných mnoho. V České republice lze zakoupit zeštíhlující olej ELANCYL Slim Design, kde jeho složky floridzin, kofein a další látky slibují zeštíhlující účinek po jednom týdnu aplikace. Cena tohoto produktu se pohybuje kolem 700 Kč [57].

Krátký text

ELANCYL Slim Design Zeštíhlující olej 150 ml. Inovace 2 v 1- Celulitida a strie. Zeštíhlení, redukce strií, drenáž.

Užití

ELANCYL Slim Design Zeštíhlující olej 150 ml. Inovace 2 v 1- Celulitida a strie. Zeštíhlující účinek již po 7-ti dnech.

Zeštíhlení, redukce strií, drenáž:

1. Zeštíhlení: odbourává a eliminuje tuky [floridzin + kofein]
2. Redukce: přispívá korekci nově vzniklých strijí
3. Drenáž: [břečťan + masáž]

Dávkování

Před použitím důkladně protřepejte. Krouživými pohyby masírujte stehna, boky a břicho. Nelepí, po aplikaci se můžete hned obléct.



Obrázek 6: Ukázka produktu ELANCYL Slim Design [57, 58]

Dalším příkladem je potravní doplněk původem z USA. Jedná se o výrobek s názvem Life Extension AppleWise Polyphenol Extract, který je tvořen extraktem polyfenolů a 5 % floridzinu z plodů a slupky jablek. Tento doplněk stravy by měl pomoci se snížením oxidačního stresu, podpořit funkci kardiovaskulárního systému a udržet v rovnováze hladinu cukru. Cena tohoto doplňku je 299 Kč [59].



Obrázek 7: Ukázka produktu LifeExtension [59]

Dalším výrobkem z Číny je Phloridzin Pure, který obsahuje 95,0 % floridzinu. Tento doplněk stravy vznikl na základě testování potkanů, u nichž byl indukovaný diabetes 1. typu podáváním streptozocinu. Tento doplněk stravy by tak mohl být využit při diabetu a obezitě. [60].



Obrázek 8: Ukázka produktu Phloridzin Pure [60]

Posledním příkladem je výrobek Green Apple 10:1 dostupný na americké webové stránce. Jedná se o kapsle s obsahem čistého extraktu ze zelených jablek. Hlavními účinnými látkami jsou zde polyfenoly, floridzin a floretin. Tento doplněk stravy by měl pomoci snížit krevní tlak, zlepšit růst a zdraví vlasů, zabránit vzniku zubního kazu, odstranit zápach z úst a předcházet alergiím. Cena produktu je 326 Kč [61].

100% NATURAL

500mg

maple life sciences™
Green Apple 10:1
Standardized Herbal Extract
Contains Phloretin & Phloridzin

* Highly Effective Antioxidant
* Maintain Healthy Heart
* Helps Remove Toxins

60 Veggie-Capsules (1 month Supply)

Dietary Supplement

Supplement Facts	
Serving Size: 1 Capsule	
Serving Per Container: 60	
Amount Per Serving	
Green Apple 10:1 Extract	500 mg *
* Daily Value is not established	

Other ingredients: Vegetable Cellulose (Veggie Capsule)
NO Yeast, Wheat, Corn, Milk, Egg, Artificial Flavors, Added Sugar or other additives.
Natural color variations may occur in this product
Store in a cool, dry place. Keep out of reach of Children.

SUGGESTED USE: Take 2 capsules daily, or as directed by a Doctor.
CAUTION: Consult your healthcare professional prior to use if you have or suspected a medical condition, are taking prescription drugs, or are pregnant or lactating.
* These statements have not been evaluated by the Food and Drug Administration. This product is not intended to diagnose, treat, cure or prevent any disease.

Manufactured by:
KAN Phytochemicals Pvt. Ltd.
1390, HSIIDC Industrial Estate Rai,
Sonapat 131029, Haryana, INDIA
Email: contact@kanphytochem.com
Website: www.kanphytochem.com

ISO 9001:2015
GMP
HALAL
KOSHER
Vegan
CERTIFIED ORGANIC

Obrázek 9: Ukázka produktu Green Apple 10:1 [61]

Doplněk stravy s 98 % výtažkem z floretinu ze slupek jablek byl vyrobený v Číně. Jedná se o bílý prášek. Floretin má stejně jako floridzin antidiabetický a antioxidační účinek, může snížit tvorbu kožního mazu, slouží k zachytávání volných radikálů, má ochranný vliv na srdce a také potlačuje tvorbu melaninu, čímž redukuje vznik tmavých skvrn na pleti [62].

4.4.2 Doplnky stravy s ostatními fenolickými látkami zmíněnými v diplomové práci

Doplnky stravy s obsahem ostatních fenolických látek jsou na tom s dostupností o něco lépe. V české lékárně lze pořídit například výrobek Vito Life kyselina chlorogenová. Jedná se o tobolky, které jsou vhodné pro redukci váhy, dále pro pacienty trpící problémy se žlučovými kameny, diabetem nebo Alzheimerovou chorobou [64]. Dostupné na internetových stránkách či v lékárnách jsou i výrobky s rutinem. V USA bylo k roku 2017 prodáváno přes 860 produktů obsahující rutin [40].



Obrázek 10: Ukázka doplňků stravy s kyselinou chlorogenovou a rutinem [64, 65]

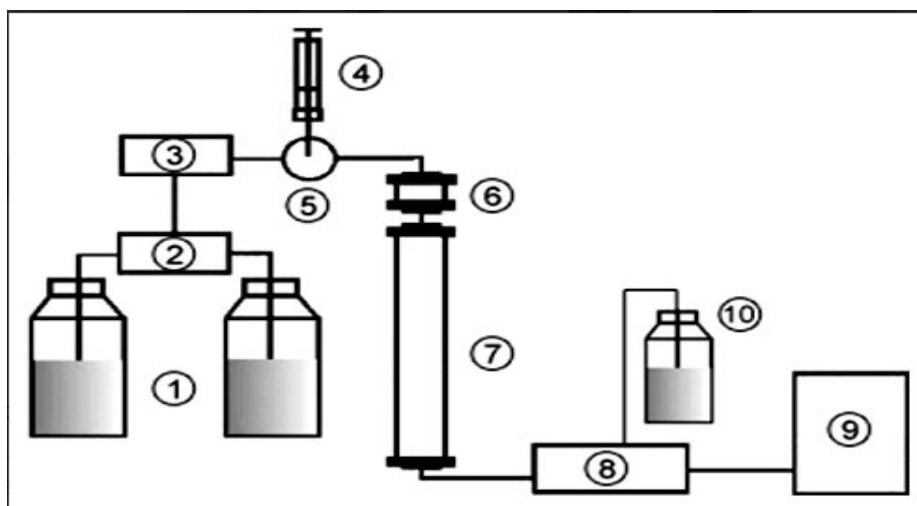
4.5 Stanovení a extrakce fenolických látek

Stanovování látek v rostlinném materiálu je víceetapový proces. Mezi tyto kroky patří správný odběr vzorku, zpracování, extrakce, separace a kvantifikace s využitím různých instrumentálních metod. Nejpoužívanější metodou pro stanovení fenolických látek je vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi. Využívají se také různé způsoby detekce, nejčastějšími jsou detektor diodového pole (DAD), spektrofotometrický (UV/VIS) či hmotnostní detektor. Dříve se pro jejich stanovení využívaly plynová, papírová chromatografie nebo chromatografie na tenké vrstvě [66].

Extrakce je proces, při kterém dochází k oddělení analytu od zbytku matrice. Je závislá na charakteru sloučeniny, jejích chemických a fyzikálních vlastnostech, koncentraci a dalších faktorech. Nejčastějšími extrakčními činidly jsou methanol, ethanol, aceton nebo dimethylsulfoxid [67].

4.6 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

HPLC se řadí mezi nejpoužívanější separační analytické metody, kdy dochází k rozdělování látek na základě ustalování rovnováhy mezi dvěma nemísitelnými fázemi a separovanými látkami: pohyblivá mobilní (MF; kapalina) a nepohyblivá stacionární (SF; sorbent uvnitř kolony). Kolonou protéká MF uložená v zásobnících mobilní fáze, která je přiváděna za vysokého tlaku do systému pomocí čerpadla. Většinou dochází k oddělenému čerpání organické a vodné složky a následně pomocí směšovače dochází k mísení složek MF. Různé analyty jsou na koloně rozdílně zadržovány a díky tomu dochází k separaci. Rychlost separace závisí na tom, zda zvolíme isokratickou či gradientovou eluci. Isokratická eluce využívá po celou dobu stejné složení mobilní fáze. Pokud chceme separaci urychlit, zvolíme eluci gradientovou, kdy dochází ke změně ve složení MF a roste eluční síla. Nejen, že dojde ke zkrácení analýzy, ale snížíme také spotřebu organických rozpouštědel. Mobilní fázi je nutné před vpuštěním do kolony odplynit v degaséru, aby se v koloně neuvolňovaly bublinky plynů, které mohou mít za následek špatnou opakovatelnost retenčních časů, jiné objemy nadávkovaných vzorků či kolísání tlaku především při gradientové eluci. Vzorky se do systému dávkuje pomocí injektoru. Nejjednodušší metodou je použití stříkačky, pomocí které se vzorek zavede do MF. Moderní techniky využívají autoinjektory (autosamplery), které umožňují opakované dávkování v nastaveném časovém intervalu. Další součástí instrumentace je termostat, jehož funkcí je zamezení teplotních výkyvů. Těsně za chromatografickou kolonou se nachází detekční systém, který zaznamenává signály při průchodu mobilní fáze s analytem. Detektor snímá změny složení MF měřením fyzikálních či chemických veličin. Nejčastějšími detektory používanými v HPLC jsou UV/VIS. V diplomové práci byl použitý DAD detektor, který snímá celé spektrum v reálném čase bez přerušování chromatografické separace, umožňuje detekovat látky při jakékoliv vlnové délce a porovnávat spektra s knihovnou spekter. Dalšími možnými detektory v HPLC jsou fluorescenční, elektrochemické, amperometrické, vodivostní, refraktometrické, univerzální detektory na bázi aerosolu nebo hmotnostní detektory. Poslední částí je počítač se softwarem, který řídí celý HPLC systém. Výsledkem procesu je chromatogram, který umožňuje identifikaci a kvantifikaci analyzovaných látek [68].



Obrázek 11: Jednotlivé komponenty kapalinového chromatografu (1- zásobníky MF, 2- směšovací zařízení, 3- čerpadlo, 4- dávkovací zařízení, 5- vícecestný ventil, 6- předkolona, 7- analytická kolona, 8- detektor, 9- počítač se softwarem, 10- nádoba na odpad) [69]

4.7 Kolony

4.7.1 Údržba kolon

Pro zajištění spolehlivých výsledků separace je klíčový výběr vhodné kolony. Při výběru správné kolony záleží na povaze látek, které chceme analyzovat, na jejich rozpustnosti a polaritě [70]. Abychom zajistili, že bude mít kolona dlouhou životnost, je vhodné dodržovat doporučení, která jsou přiložena u kolony při jejím zakoupení. Životnost kolony je obecně závislá na fyzikálních vlastnostech jako je teplota, složení a pH používané MF. Celkově může používání vysokých teplot či koncentrovaných organických rozpouštědel zkrátit životnost kolony. Pokud je to možné, je vhodné rozpustit vzorek v rozpouštědle, které má stejné složení jako mobilní fáze. Použití jiného rozpouštědla může ovlivnit symetrii píků analyzovaných látek, zejména při použití rozpouštědla s vyšší eluční silou. Není také vhodné používat kolonu opakovaně na horních tlakových limitech kolony nebo systému anebo náhlé změny tlaku. Tlak se mění v závislosti na délce kolony, teplotě, druhích organického rozpouštědla a dalších parametrech. Opakované používání mobilních fází s velkými rozdíly v polaritách mohou snížit účinnost kolony. Pro časté používání se doporučuje používat acetonitril nebo methanol. Na konci měření je vhodné kolonu promýt roztokem organického rozpouštědla, které odstraní sloučeniny, které mají velkou retenční schopnost, či další případné balastní látky z matrice. Kolona se nesmí nechat vyschnout a uchovává se v doporučeném

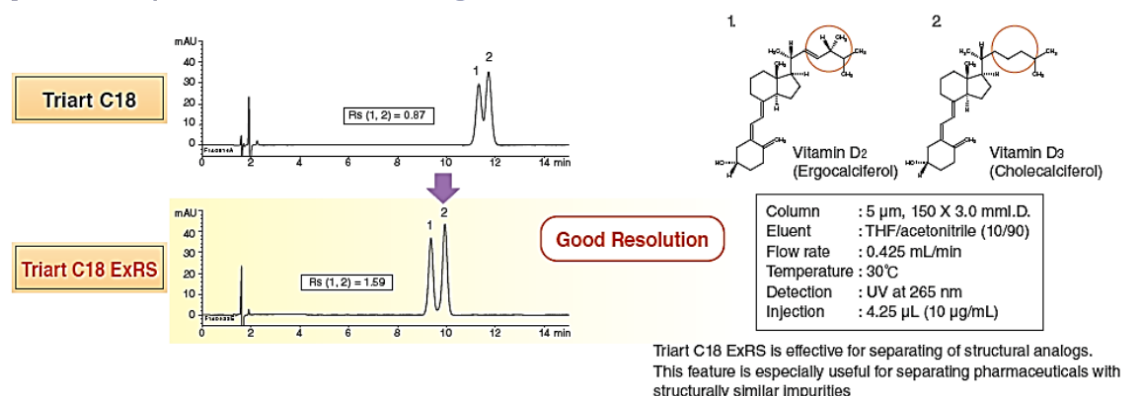
rozpouštědla a uzavírá se originálními píkovými šroubky. Před analýzou reálných vzorků je nutná adekvátní úprava, aby nedošlo k ucpání kolony či jiné degradaci stacionární fáze v ní obsažené. Vhodné je také i použití předkolon [71].

4.7.2 Kolona YMC-TRIART

V této diplomové práci byla použita kolona YMC-Triart C18 ExRS. Kolony YMC-Triart vykazují díky hybridnímu oxidu křemičitému velkou chemickou stabilitu.

Kolona YMC-Triart C18 ExRS (150 × 4,6 mm × 5 μm, 8 nm) je založená na technologii, která využívá částice organického-anorganického hybridního oxidu křemičitého a je vhodná pro hydrofobní látky s rozmezím pH 1-12 a za vysokých teplot. Lze ji použít při teplotách do 90 °C při pH 1-7 a 50 °C od pH 7-12. Kolona je hydrofobní kvůli vysokému obsahu uhlíku. Je vhodná pro separaci izomerů a strukturních analogů. Ukázka separace strukturních analogů je znázorněna na obrázku 12 [72, 73].

Ideal for separations of structural analogs



Obrázek 12: Porovnání kolon Triart C18 a Triart C18 ExRS [73]

Na obrázku výše je znázorněna separace vitamínu D2 a D3 pomocí dvou kolon Triart C18 a Triart C18 ExRS. V druhém případě došlo k lepšímu rozlišení analytů i ke zkrácení doby analýzy [73].

Studie popisuje využití této kolony pro stanovení azobarviv pomocí sekvenční injekční chromatografie (SIC) ve vybraném koření. Tento sorbent nabízí také nižší zpětný tlak (o 30 % nižší než u porézních částic). Kolona YMC-Triart C18 byla porovnávána s dalšími třemi kolonami, a to: Merck Chromolith SpeedROD RP-18e, Merck Chromolith FastGradient RP-18e (monolitické kolony) a Supelco Ascentis Express C18 (kolona s core-shell částicemi). Vícevrstevná kolona má výhodné funkce pro SIC, protože je stabilní při změnách složení MF a vyžaduje minimální čas pro opětovnou ekvilibraci.

Výsledky této studie ukázaly, že nejnižší zpětný tlak byl u klasické monolitické kolony Merck Chromolith SpeedROD RP-18e, ostatní sledované parametry však byly horší než u ostatních kolon. Kolona Merck Chromolith FastGradient RP-18e vynikala symetrií píků, nižší spotřebou MF a nižšími náklady na analýzu, ale úzký průměr kolony omezoval průtok MF. Kolona s core-shell částicemi měla velkou separační účinnost, fyzikálně-chemické vlastnosti a zpětný tlak však byly horší než u kolony vícevrstevné. Z tohoto důvodu byla zvolena kolona YMC Triart C18 [83].

V diplomové práci „Stanovení floridzinu a jiných fenolických látek v listech jabloní pomocí HPLC“ byly porovnávány kolony YMC-Triart C18 a YMC-Triart ExRS, kde se ukázalo, že vhodnější kolonou pro stanovení fenolických látek (kyseliny gallové, kyseliny chlorogenové, epikatechinu, rutinu, kvercitrinu, floridzinu, kvercitinu a floretinu) byla právě YMC-Triart C18 ExRS, u které došlo k lepšímu rozlišení jednotlivých analytů [74].

Kolona YMC-Triart C18 ExRS byla testována i v diplomové práci s názvem „Vývoj HPLC metody pro stanovení vybraných fenolických kyselin a flavonoidů v Tokajských vínech“. Společně s touto kolonou byly testovány další dvě kolony, kdy však z důvodu zkrácení analýzy a lepší účinnosti byla vhodnější kolona Ascentis Express F5 s pentafluorofenolovou stacionární fází [75].

4.8 Příklady stanovení fenolických látek v jabloních v předchozích studiích

Tabulka 3: Přehled separačních podmínek v předchozích studiích

Materiál	Stanovované látky	Mobilní fáze	Typ kolony	Detekce	Zdroj
Listy jabloní	Katechin, k. chlorogenová, k. kofeinová, epikatechin, rutin, hyperosid, floretin, isoquercitrin, aviklinin, kvercitrin, floridzin	H ₂ O + 2% CH ₃ COOH, ACN	YMC-Pack ODS-A C18 (250 × 4,6 mm × 5 μm) Předkolona: YMC-Triart C18 (10 × 3 mm × 5 μm)	PDA	[3]
Listy jabloní	k. chlorogenová, kvercitrin, isokvercitrin, hyperosid, k. p-hydroxybenzoová	ACN, H ₃ PO ₄	Thermo Scientific Aquasil C18 (250 × 4,6 mm × 5 μm)	PDA	[76]
Jablečné slupky, dužina	Arbutin, k. gallová, katechin, k. chlorogenová, k. kofeinová, epikatechin, rutin, floridzin, kvercetin	H ₃ PO ₄ , ACN	Nucleosil 120 C18 (250 × 4,6 mm × 5 μm)	PDA	[77]
Jablečný mošt	Floridzin, rutin, epikatechin, k. chlorogenová, k. gallová, katechin, k. skořicová, k. pyrotokatechová, k. p-kumarová, k. kávová, k. ferulová	H ₂ O + 2% CH ₃ COOH, H ₂ O + ACN + 0,5% CH ₃ COOH	Waters xTerra MS C1 (250 mm × 4,6 mm × 5 μm)	UV/VIS	[78]
Kůra jabloní	Floridzin	H ₂ O + MetOH + CH ₃ COOH	Agilent Eclipse XDB-C18 (150 mm × 4,6 mm × 5 μm)	UV/VIS	[79]
Nezralá jablka	Floretin-2'-O-glukuronid, floretin-O-glukuronid, floretin, floridzin	H ₂ O + 1% HCOOH, MetOH	Inertsil ODS-3 (150 mm × 4,6 mm × 5 μm)	PDA	[28]
Jablka	k. felurová, k. chlorogenová, k. kávová, k. p-kumarová, k. skořicová, kvercetin, rutin, florizin, floretin	H ₂ O + 1% CH ₃ COOH, MetOH	Luna C-18 (250 × 4,6 mm × 5 μm)	PDA	[80]
Jablečné listy, slupky	Katechin, k. chlorogenová, epikatechin, k. kumarová, kvercetin-rutinosid, kvercetin-galaktosid, kvercetin-glukosid, kvercetin-rhamnosid, floridzin, kvercetin, floretin	1% HCOOH + 0,5% MetOH, ACN	XTerra MS C18 (250 × 4,6 mm × 5 μm)	PDA	[81]

Z této tabulky vyplývá, že pro stanovení fenolických látek v různých materiálech jabloní se obvykle využívá metoda HPLC s PDA detekcí. K separaci látek byla nejčastěji zvolena kolona s C18 sorbentem. Jako organická složka mobilní fáze byl zvolen často acetonitril, případně methanol, vodnou složku většinou tvořila kyselina mravenčí či kyselina octová.

5 Experimentální část

5.1 Pomůcky

5.1.1 Přístroje, laboratorní nádobí a další:

Třecí miska, tlouček, špachtlička, kádinky, ependorfky, vialky, injekční stříkačky, filtry, mixér, centrifuga, ultrazvuková vana, analytická váha, HPLC systém a PC

5.2 Materiál

5.2.1 Použitý rostlinný materiál

Veškerý materiál byl dodán Výzkumným a šlechtitelským ústavem ovocnářským Holovousy s.r.o. Celkem se pracovalo s deseti klasickými a třemi starými odrůdami různých rostlinných částí jabloní a s odpadní dřevitou částí jabloně – štěpkou. Dodaný materiál byl závislý na vegetačním období.

První odběr probíhal v období březen-duben 2020 a sledovaným materiálem bylo listí, kůra, pupeny a květy u 10 základních odrůd. Sběr materiálu probíhal od 31.03. do 17.04.2020.

Druhý odběr byl proveden v období červen 2020. V tomto období se u deseti klasických odrůd odebíralo listí a kůra a u tří vzácných odrůd listy. Zároveň proběhl odběr štěpky. Odběr probíhal 01.06.2020.

Třetí odběr probíhající v období srpen 2020 zahrnoval sběr listí a kůry u deseti klasických odrůd. Sběr materiálu byl proveden 04.08.2020.

Čtvrtý odběr probíhající v říjnu 2020 také zahrnoval sběr listí a kůry u deseti klasických odrůd. Sběr materiálu byl proveden 27.10.2020.

Celkem tedy bylo použito pro analýzu 43 vzorků listí, 43 vzorků kůry, 10 vzorků pupenů, 10 vzorků květů, 1 vzorek štěpky a 9 vzorků plodů od 13 odrůd jabloní ('Topaz', 'Golden Delicious', 'Angold', 'Meteor', 'Melrose', 'Fuji', 'Braeburn', 'Lady Silvia', 'Rubinstep', 'Rubín', 'Šampašská Reneta', 'Jadernička moravská' a 'Holovouské malinové'). Štěpka byla připravena smícháním 4 odrůd: 'Golden Delicious', 'Lady Silvia', 'Rubinola' a 'Angold'.

5.3 Použité chemikálie

5.3.1 Standardy:

Floridzin dihydrát 99 %, Sigma-Aldrich

Floretin \geq 99 %, Sigma-Aldrich

Kyselina chlorogenová \geq 95 %, Sigma-Aldrich

Rutin $>$ 94 %, Sigma-Aldrich

Kvercitrin \geq 78 %, Sigma-Aldrich

5.3.2 Rozpouštědla:

Methanol (Sigma-Aldrich)

Kyselina fosforečná (Sigma-Aldrich)

Acetonitril (Sigma-Aldrich)

Ultračistá voda

5.4 Příprava vzorků

Všechny materiály bylo nutné nejprve důkladně usušit a zhomogenizovat. Sušení probíhalo za pokojové teploty zhruba 2 týdny. Homogenizace se prováděla v třecí misce nebo v mixéru dle množství materiálu. Každý vzorek se roztřel na jemný prášek. Od každé odrůdy byly uchovány zásobní vzorky pro případ, že by byla potřeba opakovat měření. Před homogenizací se ještě ze vzorků odstraňovaly přebytečné „tvrdé“ části, které by mohly ovlivnit výtěžnost analytů a opakovatelnost stanovení (například u listů se jednalo o řapíky, u kůry se odstraňovala dřevnatá část).

Na analytických vahách bylo od každé odrůdy odváženo do malých centrifugačních endorfek o objemu 2 ml přibližně 50,00 mg zhomogenizovaného materiálu. Následovala extrakce methanolem s přídavkem 0,1% kyseliny mravenčí. Při extrakci se všechny vzorky umístily na 30 minut do ultrazvukové vany a během toho se vždy po 10 minutách protřepaly. Poté byly vzorky přemístěny na 15 minut do centrifugy (při 25 °C a 5000 rpm). Posledním krokem byla filtrace do předem popsaných vialek. Používaly se injekční stříkačky a speciální PTFE stříkačkové filtry o velikosti pórů 0,22 μ m. Takto upravené vzorky byly uchovány v lednici při teplotě 4 °C

a připraveny pro analýzu. Nakonec pro měření antioxidační aktivity byly extrakty 20krát zředěny.

5.5 Příprava roztoků

5.5.1 Extrakční roztok

Pro přípravu extrakčního roztoku byl použit methanol s přidavkem 0,1% kyseliny mravenčí. Do 100 ml odměrné baňky bylo napipetováno 100 μ l kyseliny mravenčí, zbytek nádoby byl doplněn methanolem po rysku. Takto připravený roztok byl dobře protřepán a po 2 ml přepipetovaný do ependorfeek se vzorky.

5.5.2 Zásobní roztoky standardů

Zásobní roztoky standardů byly připraveny o koncentraci 0,5 mg/ml pro rutin, kvercitrin, floretin a kyselinu chlorogenovou. Standard floridzinu byl připraven o koncentraci 5 mg/ml. Rozpouštědlem byl methanol.

5.5.3 Směsný roztok standardů

Směsný roztok byl vytvořen odpipetováním 50 μ l floridzinu, 25 μ l rutinu, 25 μ l kvercitrinu, 25 μ l floretinu, 25 μ l kyseliny chlorogenové a následným přidáním 350 μ l methanolu. Směsný roztok byl použit pro ověření retenčních časů při chromatografické separaci. Koncentrace jednotlivých standardů ve směsi byla u floridzinu 500 mg/l a u ostatních 25 mg/l.

5.5.4 Příprava mobilní fáze

Při separaci analytů byly použity 2 mobilní fáze. Mobilní fázi A tvořil acetonitril, mobilní fáze B byla tvořena 0,1% kyselinou fosforečnou.

5.6 Podmínky analýzy

Pro stanovení fenolických látek byla použita již vyvinutá a validovaná metoda [74]. Přístroje a podmínky separace jsou shrnuty v následující tabulce.

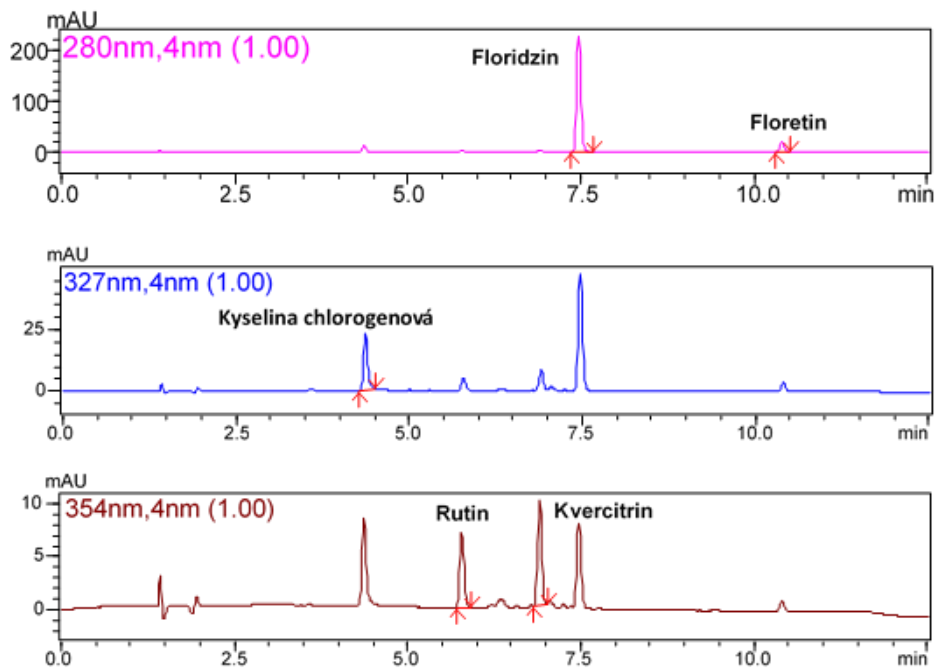
Tabulka 4: Podmínky analýzy

Chromatografická souprava	Schimadzu LC-10
Kolona	YMC-Triart C18 ExRS 150 × 4,6 mm, 5 μm, 8 nm
Teplota	30 °C
Mobilní fáze	A – acetonitril, B – ultračistá voda + kyselina fosforečná (0,1%), pH = 2,2
Průtoková rychlost	1 ml/min
Nástřik	1 μl
Celková doba analýzy	12,51 min
Detektor	DAD detektor SPM-M10A VP
Detekce	280 nm (floridzin, floretin) 327 nm (kyselina chlorogenová) 354 nm (rutin, kvercitrin)
Vyhodnocení	Software LC Labsolution

Pro zajištění správných výsledků byly od každého vzorku provedeny celkem 3 nástřiky. U směsného porovnávacího roztoku standardů se prováděly 3 nástřiky na začátku a 3 nástřiky na konci každé sekvence. Pomocí srovnání retenčních časů standardů a retenčních časů jednotlivých vzorků byla ověřena identita separovaných látek. Pro zjištění koncentrace analytů byla použita integrovaná plocha pod píky dosazená do vzorců pro výpočet.

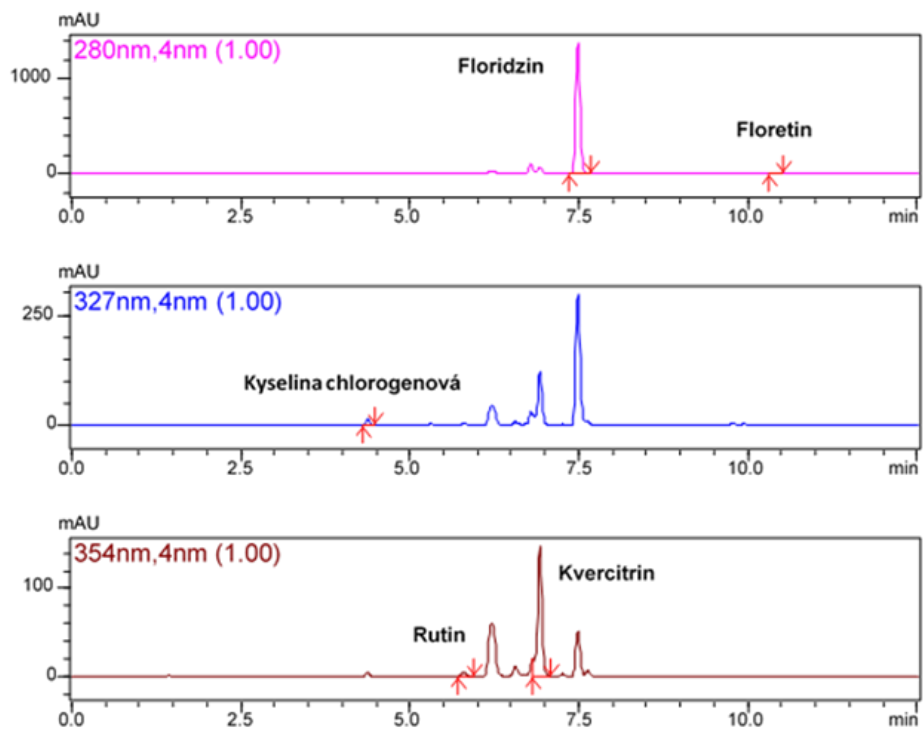
Analýza fenolických látek v ovoci byla provedena Mgr. Marcelou Hollou. Výsledky byly použity pro komplexní zhodnocení jabloně z hlediska obsahu fenolických látek. Pro doplnění byla kolektivem Radanal s.r.o. (vědecká analytická laboratoř) změřena i celková antioxidační aktivita pomocí metody průtokové injekční analýzy FIA- ECD [82].

5.6.1 Příklad chromatogramu směsi standardů



Obrázek 13: Chromatogramy směsi standardů

5.6.2 Příklad chromatogramu reálného extraktu



Obrázek 14: Chromatogramy vzorku listů odrůdy 'Topaz' z měsíce srpen

5.6.3 Průměrné hodnoty retenčních časů jednotlivých standardů

Tabulka 5: Retenční časy standardů

Standard	Retenční čas t_r [min]
Kyselina chlorogenová	4,30
Rutin	5,73
Kvercitrin	6,90
Floridzin	7,46
Floretin	10,39

5.6.4 Výpočet koncentrace fenolických látek

Ze všech tří nástriků od každého vzorku byl zhotovený průměr plochy pod píkem, který se následně přepočítal na požadovanou navážku 0,05 g. Vzorec pro tento výpočet je následující:

$$X = A * 0,05 / m$$

X... hledaná hodnota

A... průměrná plocha pod píky

m... hmotnost navážky

Následně byla hledaná hodnota X dosazena do vzorce pro výpočet koncentrace fenolických látek v mg/ml:

$$c_x = (A_x / A_{ST}) * c_{ST}$$

c_x ... koncentrace analytu

A_x ... průměrná plocha píku analytu

A_{ST} ... průměrná plocha píku standardu

c_{ST} ... koncentrace standardu

Nakonec se provedl přepočet výsledné hodnoty na čistotu daného standardu a na navážku rostlinného materiálu tak, aby mohl být výsledek prezentován v mg případně v μg na 1 g sušeného materiálu či ovoce.

6 Výsledky

6.1 Obsah fenolických látek v jednotlivých odrůdách

V následujícím textu bude zobrazen obsah fenolických látek v jednotlivých odrůdách. V tabulkách jsou zobrazené naměřené koncentrace v mg/g (u plodů v µg/g). V grafech je zobrazena závislost obsahu fenolických látek na vegetačním období a druhu materiálu.

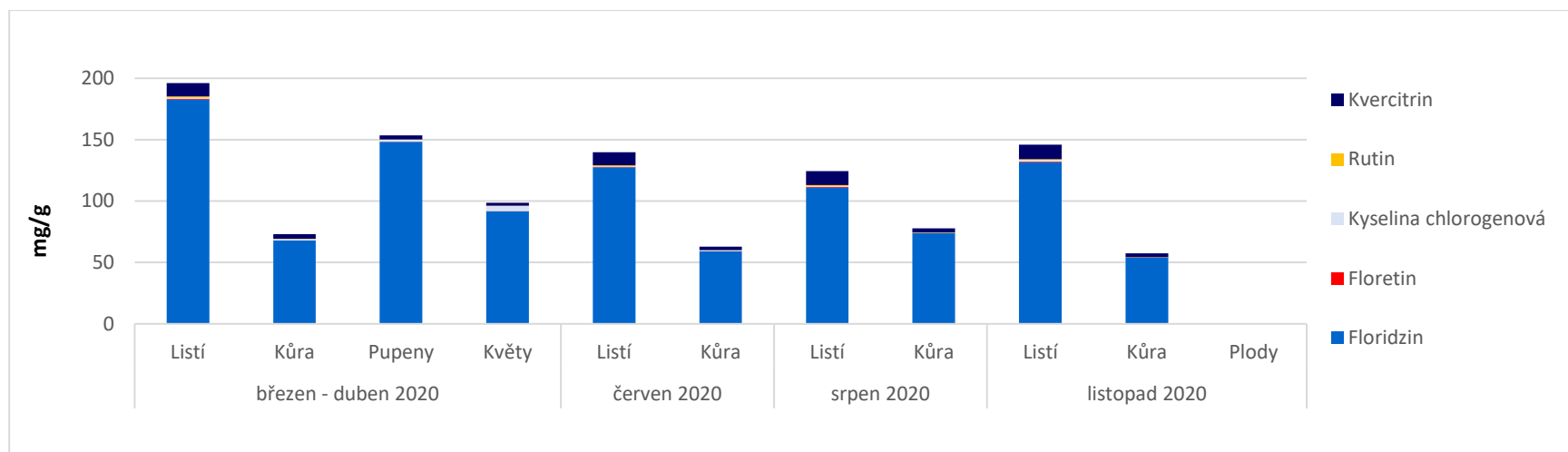
6.1.1 'Topaz'

Tabulka 6: Koncentrace (v mg/g a v µg/g u plodů) fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Topaz'

'Topaz'	Březen-duben 2020				Červen 2020		Srpen 2020		Listopad 2020		
	Listí	Kůra	Pupeny	Květy	Listí	Kůra	Listí	Kůra	Listí	Kůra	Plody*
Floridzin	182,69	67,92	148,25	91,78	127,52	58,98	110,98	74,09	131,67	54,08	6,85
Floretin	0,56	0,01	0,14	0,04	0,31	0,02	0,54	0,03	0,52	0,01	–
Kys. chlorogenová	1,01	1,19	1,54	4,13	0,61	0,86	0,7	0,16	1,08	0,23	48,41
Rutin	0,87	0,12	0,14	0,31	0,72	0,1	0,7	0,09	0,75	0,1	3,22
Kvercitrin	10,98	3,77	3,34	2,32	10,71	2,94	11,43	3,48	11,93	2,92	57,84
Katechin	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	11,04
Epikatechin	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	51,12
Celkem	196,11	73,01	153,41	98,58	139,87	62,9	124,35	77,85	145,95	57,34	178,49

*Koncentrace u plodů je z důvodu nízké koncentrace v mg/g uvedena v µg/g

Graf 1: Fenolické látky v odrůdě 'Topaz' v mg/g



*Koncentrace fenolických látek v plodech je v porovnání s ostatním měřeným materiálem velmi nízká, proto není v grafu patrná.

Z tabulky a grafu vyplývá, že ve všech použitých materiálech (kromě plodů) a v každém vegetačním období výrazně převládá zastoupení floridzinu proti dalším stanovovaným fenolickým látkám. Dále je možné vyčíst, že nejvyšší obsah fenolických látek se nachází v listí. Období březen–duben, kdy probíhalo první měření, je na fenolické látky bohaté nejvíc. Floridzin a skupina jemu příbuzných látek se totiž hojně vyskytuje i v pupenech a květech. V dalších obdobích můžeme sledovat pokles fenolických látek v listech o více než 25 %. Druhou nejvýrazněji zastoupenou látkou po floridzinu je kvercitrin. U plodů jsou nejvíce zastoupené látky epikatechin, kvercitrin a kyselina chlorogenová.

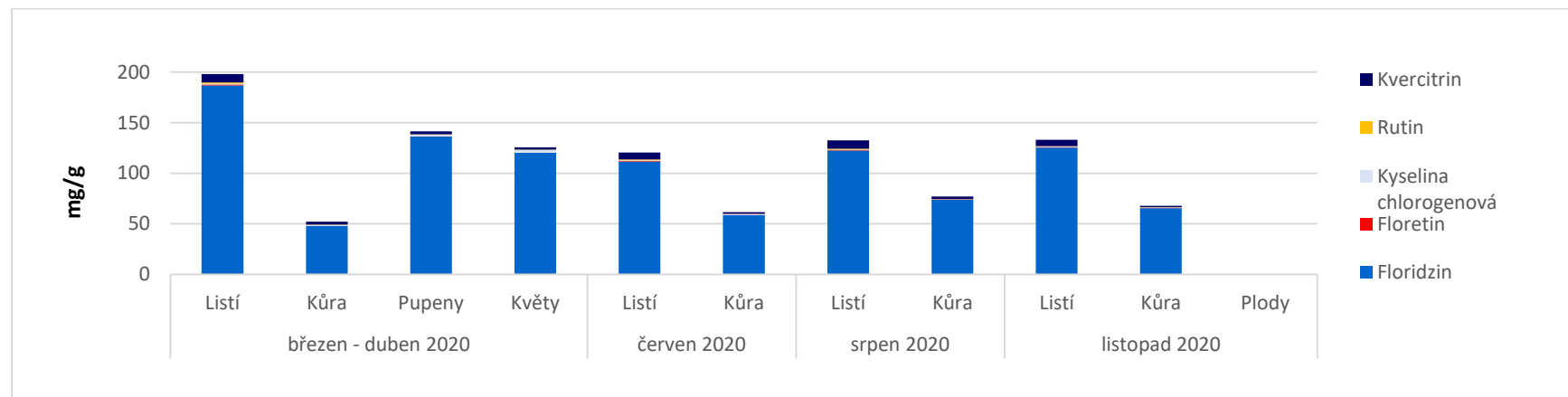
6.1.2 'Golden Delicious'

Tabulka 7: Koncentrace (v mg/g a v µg/g u plodů) fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Golden Delicious'

'Golden Delicious'	Březen-duben 2020				Červen 2020		Srpen 2020		Listopad 2020		
	Listí	Kůra	Pupeny	Květy	Listí	Kůra	Listí	Kůra	Listí	Kůra	Plody*
Floridzin	186,9	47,72	136,32	120,19	111,61	58,58	122,41	73,91	125,29	65,66	8,85
Floretin	0,72	0,01	0,2	0,11	0,56	0,01	0,53	0,03	0,48	0,01	–
Kys. chlorogenová	0,95	1,3	1,96	2,66	0,67	1,08	0,43	0,32	0,61	0,52	30,17
Rutin	1,06	0,25	0,14	0,32	0,86	0,12	0,85	0,21	0,48	0,08	2,47
Kvercitrin	8,26	2,76	2,71	2,4	6,71	1,87	8,2	2,41	6,26	1,57	30,54
Katechin	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,62
Epikatechin	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	17,00
Celkem	197,89	52,04	141,33	125,68	120,41	61,66	132,42	76,88	133,12	67,84	90,64

*Koncentrace u plodů je z důvodu nízké koncentrace v mg/g uvedena v µg/g

Graf 2: Fenolické látky v odrůdě 'Golden Delicious' v mg/g



*Koncentrace fenolických látek v plodech je v porovnání s ostatním měřeným materiálem velmi nízká, proto není v grafu patrná.

V odrůdě 'Golden Delicious' byly naměřeny nejvyšší hodnoty fenolických látek v prvním vegetačním období (březen-duben), a to v listech. Floridzin byl nejvíce zastoupen ve všech typech materiálu (kromě plodů), velké zastoupení floridzinu bylo kromě listů i v pupenech. Druhou nejvíce zastoupenou látkou je kvercitrin. Jeho zastoupení je nejvyšší opět v listech. V kůře je zastoupení fenolických látek téměř o poloviční množství menší než v jiných materiálech. V plodech bylo největší zastoupení kyseliny chlorogenové a kvercitrinu.

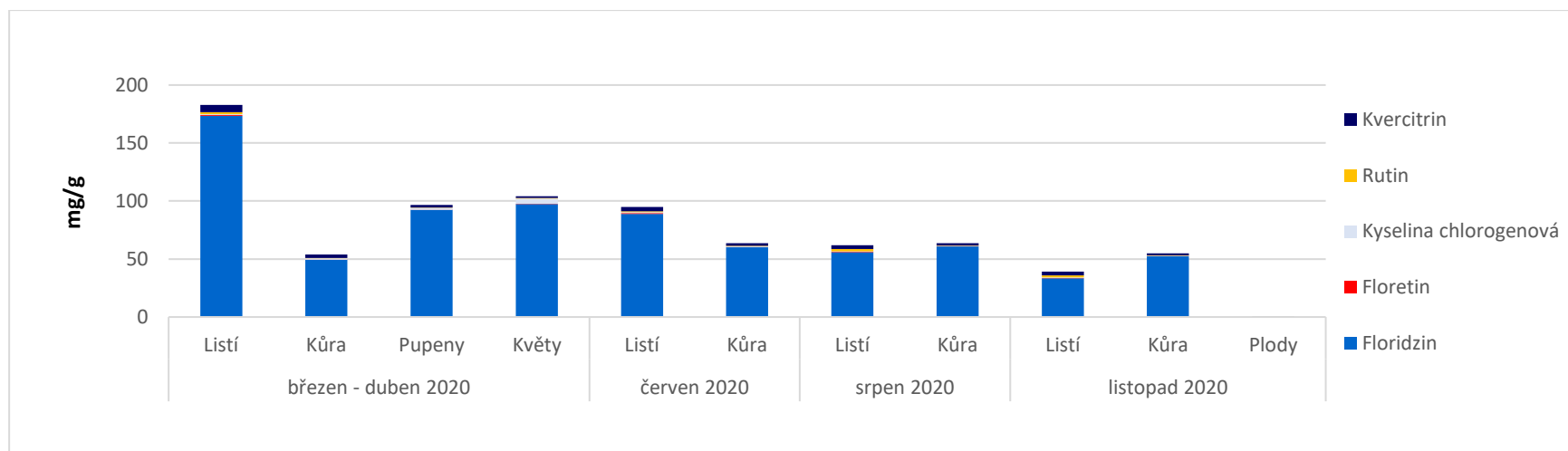
6.1.3 'Angold'

Tabulka 8: Koncentrace (v mg/g a v µg/g u plodů) fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Angold'

'Angold'	Březen-duben 2020				Červen 2020		Srpen 2020		Listopad 2020		
	Listí	Kůra	Pupeny	Květy	Listí	Kůra	Listí	Kůra	Listí	Kůra	Plody*
Floridzin	173,44	49,32	92,34	97,45	88,94	60,13	55,89	60,9	33,4	52,29	5,50
Floretin	0,58	0,01	0,13	0,06	0,72	0,02	0,37	0,02	0,3	0,01	–
Kys. chlorogenová	0,77	1,39	1,73	4,7	0,61	0,8	0,26	0,38	0,54	0,55	67,51
Rutin	1,88	0,26	0,12	0,43	0,95	0,43	2,05	0,28	1,54	0,2	9,41
Kvercitrin	6,07	2,79	2,25	1,5	3,7	2,15	3,32	2,02	3,39	1,87	12,64
Katechin	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Epikatechin	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	11,17
Celkem	182,74	53,77	96,57	104,14	94,92	63,53	61,89	63,6	39,17	54,92	106,22

*Koncentrace u plodů je z důvodu nízké koncentrace v mg/g uvedena v µg/g

Graf 3: Fenolické látky v odrůdě 'Angold' v mg/g



*Koncentrace fenolických látek v plodech je v porovnání s ostatním měřeným materiálem velmi nízká, proto není v grafu patrná.

Z těchto údajů vyplývá, že největší obsah fenolických látek byl v listech v období březen-duben. Při posledním listopadovém měření bylo větší zastoupení fenolických látek v kůře než v listí, k čemuž u žádné jiné odrůdy nedochází. V plodech bylo největší zastoupení kyseliny chlorogenové.

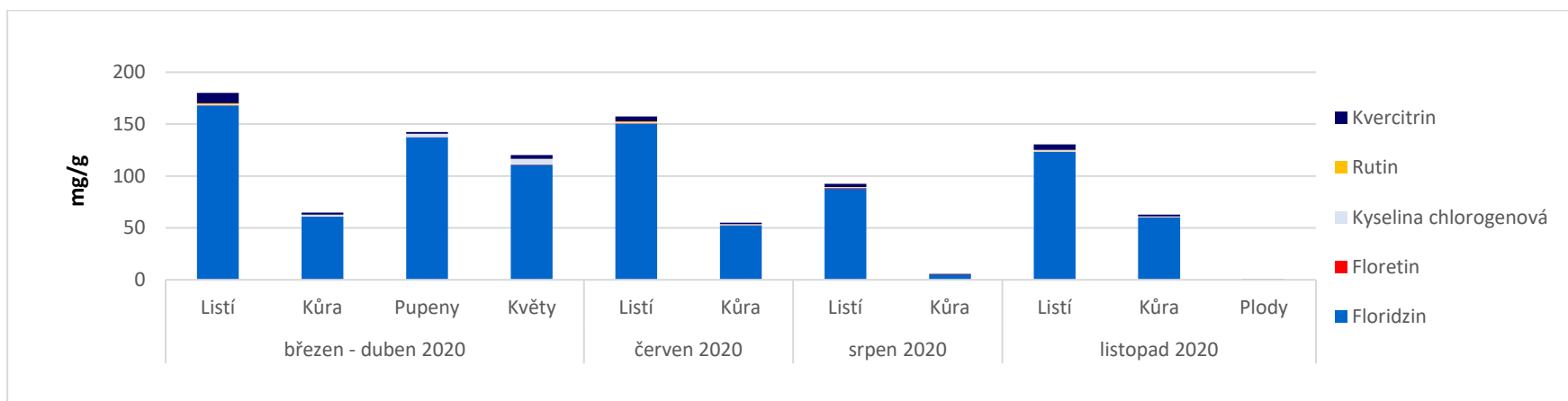
6.1.4 'Meteor'

Tabulka 9: Koncentrace (v mg/g a v µg/g u plodů) fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Meteor'

'Meteor'	Březen-duben 2020				Červen 2020		Srpen 2020		Listopad 2020		
	Listí	Kůra	Pupeny	Květy	Listí	Kůra	Listí	Kůra	Listí	Kůra	Plody*
Floridzin	167,83	60,92	137,33	110,88	150,1	52,44	88,12	4,56	123,12	60,35	8,20
Floretin	0,34	0,01	0,03	0,06	0,72	0,02	0,4	0,01	0,45	0,02	–
Kys. chlorogenová	0,79	1,66	3,21	5,27	1,03	0,91	0,48	0,04	1,02	0,51	4,94
Rutin	1,11	0,21	0,08	0,4	0,77	0,14	0,52	0,23	0,72	0,16	5,34
Kvercitrin	9,9	1,96	1,65	3,63	4,6	1,39	2,95	0,91	5,12	1,75	28,49
Katechin	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Epikatechin	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	15,67
Celkem	179,97	64,76	142,3	120,24	157,22	54,9	92,47	5,75	130,43	62,79	62,65

*Koncentrace u plodů je z důvodu nízké koncentrace v mg/g uvedena v µg/g

Graf 4: Fenolické látky v odrůdě 'Meteor' v mg/g



*Koncentrace fenolických látek v plodech je v porovnání s ostatním měřeným materiálem velmi nízká, proto není v grafu patrná.

Z těchto údajů je patrné, že obsah fenolických látek byl nejvyšší v období března-dubna v listech. Velké zastoupení floridzinu bylo i v pupenech a květech. V kůře bylo zastoupení fenolických látek o více než polovinu menší. V srpnu při třetím měření bylo naměřeno minimální množství fenolických látek. U plodů byl nejvíce zastoupený kvercitrin.

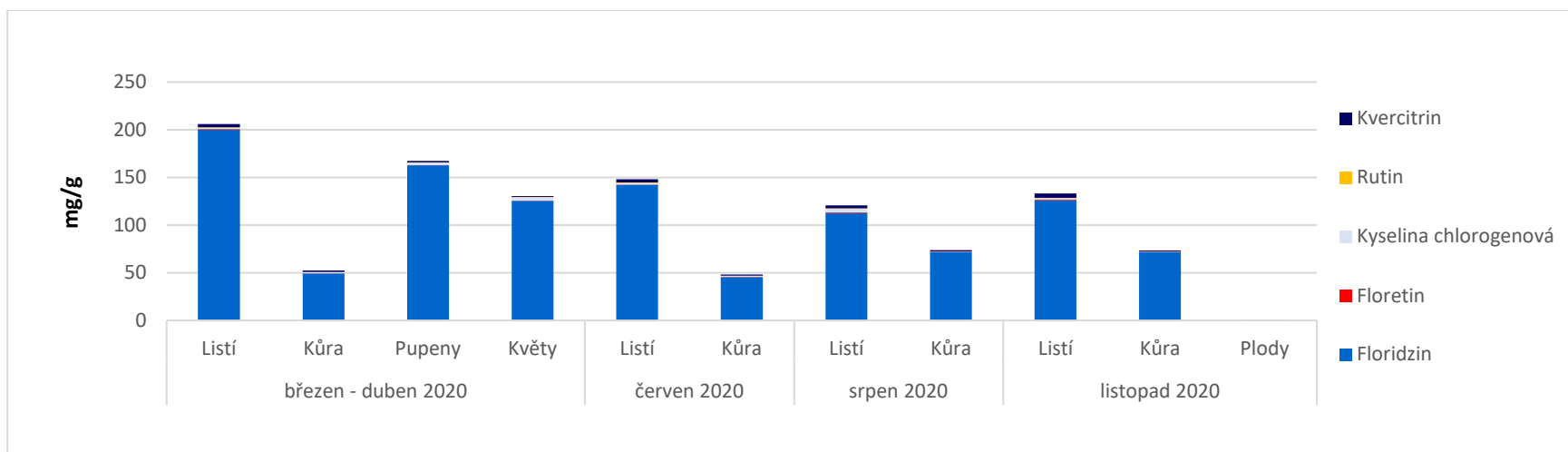
6.1.5 'Melrose'

Tabulka 10: Koncentrace (v mg/g a v µg/g u plodů) fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Melrose'

'Melrose'	Březen-duben 2020				Červen 2020		Srpen 2020		Listopad 2020		
	Listí	Kůra	Pupeny	Květy	Listí	Kůra	Listí	Kůra	Listí	Kůra	Plody*
Floridzin	200,17	49,44	162,63	125,58	142,18	45,57	112,87	71,64	126,22	71,54	11,20
Floretin	0,7	0,01	0,54	0,07	0,51	0,03	0,42	0,02	0,87	0,01	–
Kys. chlorogenová	1,08	1,33	2,42	3,48	1,36	1,12	3,87	0,6	1,33	0,65	17,29
Rutin	0,6	0,14	0,11	0,28	0,64	0,12	0,43	0,09	0,29	0,05	1,10
Kvercitrin	3,34	1,67	1,5	0,89	3,56	1,25	2,95	1,48	4,36	1,34	10,14
Katechin	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	6,06
Epikatechin	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	37,22
Celkem	205,89	52,59	167,2	130,3	148,25	48,09	120,54	73,83	133,07	73,59	83,02

*Koncentrace u plodů je z důvodu nízké koncentrace v mg/g uvedena v µg/g

Graf 5: Fenolické látky v odrůdě 'Melrose' v mg/g



*Koncentrace fenolických látek v plodech je v porovnání s ostatním měřeným materiálem velmi nízká, proto není v grafu patrná.

Z tabulky a grafu vyplývá, že u této odrůdy byl největší obsah fenolických látek v listech v období březem-dubem. Opět ve všech vzorcích odpadních produktů jabloní výrazně převažuje floridzin a nejmenší množství fenolických látek nalezneme v kůře. V plodech je nejvíce zastoupen epikatechin.

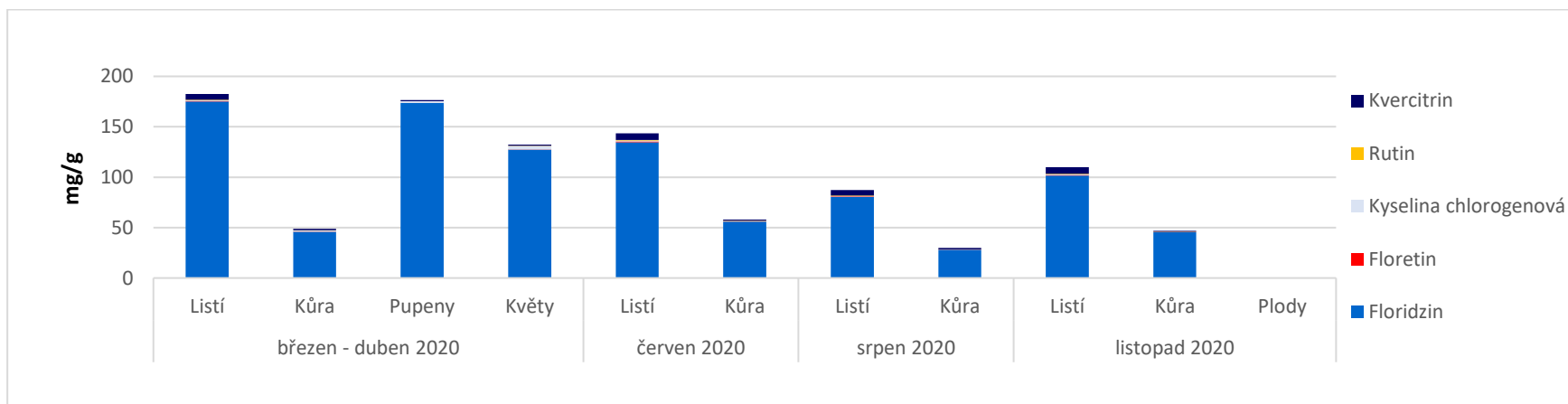
6.1.6 'Fuji'

Tabulka 11: Koncentrace (v mg/g a v µg/g u plodů) fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Fuji'

'Fuji'	březen-duben 2020				červen 2020		srpen 2020		listopad 2020		
	Listí	Kůra	Pupeny	Květy	Listí	Kůra	Listí	Kůra	Listí	Kůra	Plody*
Floridzin	175,13	45,96	173,63	127,36	134,57	56,06	80,49	28,09	101,65	45,45	11,37
Floretin	0,46	0,01	0,08	0,06	0,94	0,01	0,33	0,01	0,43	0,01	–
Kys. chlorogenová	0,57	1,09	1,52	3,36	0,92	0,53	0,34	0,35	0,61	0,3	32,45
Rutin	0,53	0,19	0,13	0,26	0,42	0,15	0,57	0,07	0,76	0,1	1,62
Kvercitrin	5,88	1,51	1,09	1,39	6,71	1,15	5,53	1,24	6,56	0,94	14,72
Katechin	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	7,86
Epikatechin	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Celkem	182,57	48,76	176,45	132,43	143,56	57,9	87,26	29,76	110,01	46,8	68,01

*Koncentrace u plodů je z důvodu nízké koncentrace v mg/g uvedena v µg/g

Graf 6: Fenolické látky v odrůdě 'Fuji' v mg/g



*Koncentrace fenolických látek v plodech je v porovnání s ostatním měřeným materiálem velmi nízká, proto není v grafu patrná.

U odrůdy 'Fuji' je výrazné zastoupení floridzinu v listí a pupenech. Obsah floridzinu v listí od března do srpna pozvolně klesá, při čtvrtém měření v listopadu hladina opět stoupla. Oproti ostatnímu materiálu můžeme v listech vidět kromě floridzinu i určité množství kvercitrinu. V plodech převažuje kyselina chlorogenová.

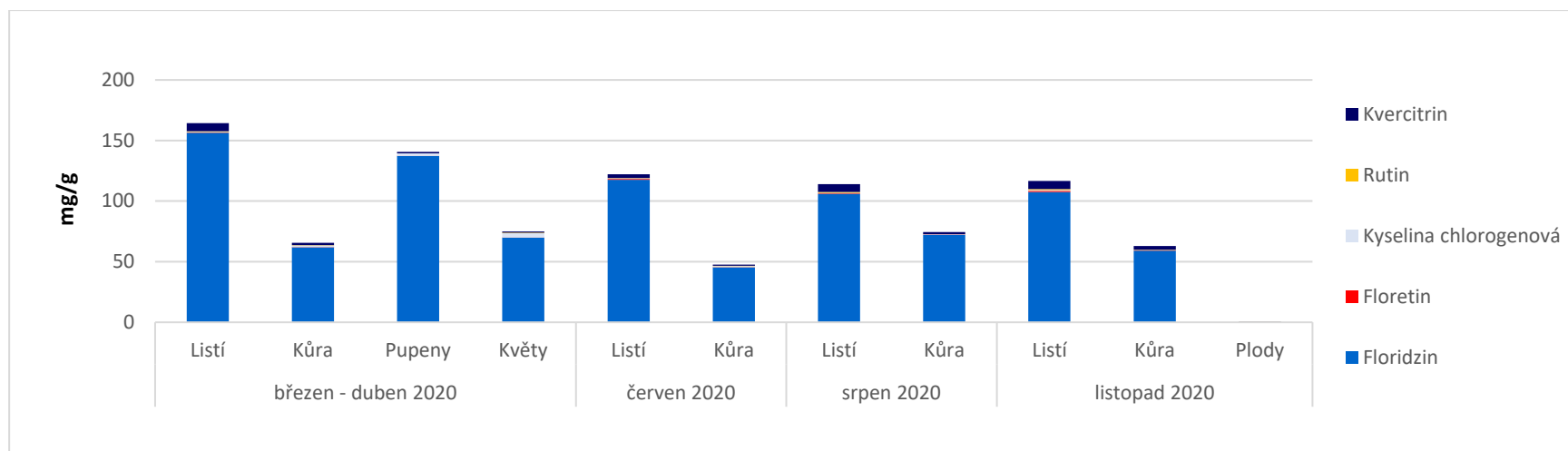
6.1.7 'Braeburn'

Tabulka 12: Koncentrace (v mg/g a v µg/g u plodů) fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Braeburn'

'Braeburn'	Březen-duben 2020				Červen 2020		Srpen 2020		Listopad 2020		
	Listí	Kůra	Pupeny	Květy	Listí	Kůra	Listí	Kůra	Listí	Kůra	Plody*
Floridzin	156,33	61,96	137,23	69,83	117,61	45,52	106,09	72,4	107,55	59,22	13,22
Floretin	0,37	0,07	0,07	0,06	0,72	0,02	0,37	0,02	0,88	0,01	–
Kys. chlorogenová	0,47	1,41	2,05	3,72	0,51	0,9	0,41	0,38	0,75	0,42	56,40
Rutin	0,5	0,16	0,11	0,26	0,18	0,1	0,77	0,08	0,85	0,07	4,78
Kvercitrin	6,58	2,01	1,09	1,04	3,19	1,08	6,42	1,48	6,68	3,17	14,66
Katechin	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	5,98
Epikatechin	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Celkem	164,25	65,61	140,55	74,91	122,21	47,62	114,06	74,36	116,71	62,89	95,04

*Koncentrace u plodů je z důvodu nízké koncentrace v mg/g uvedena v µg/g

Graf 7: Fenolické látky v odrůdě 'Braeburn' v mg/g



*Koncentrace fenolických látek v plodech je v porovnání s ostatním měřeným materiálem velmi nízká, proto není v grafu patrná.

U odrůdy 'Braeburn' je možné pozorovat vyšší zastoupení fenolických látek v listí a pupenech než v kůře a květech. Největší obsah floridzinu a jemu příbuzných látek byl v listech v období březen-duben. V kůře bylo největší množství floridzinu v srpnu. V plodech bylo výrazné zastoupení kyseliny chlorogenové.

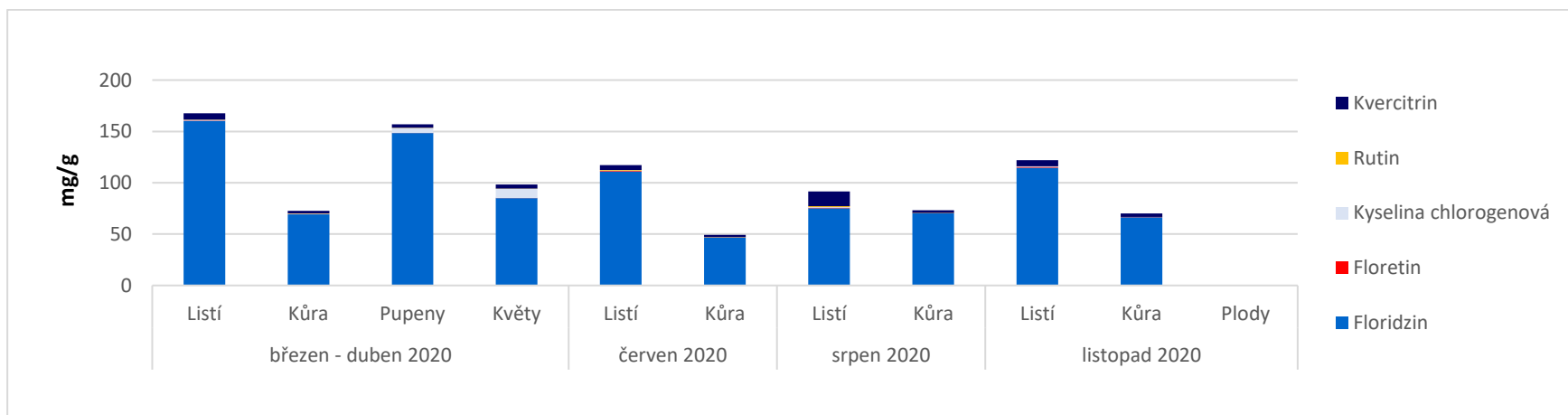
6.1.8 'Lady Silvia'

Tabulka 13: Koncentrace (v mg/g a v µg/g u plodů) fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Lady Silvia'

'Lady Silvia'	Březen-duben 2020				Červen 2020		Srpen 2020		Listopad 2020		
	Listí	Kůra	Pupeny	Květy	Listí	Kůra	Listí	Kůra	Listí	Kůra	Plody*
Floridzin	160,29	69,19	148,36	85,16	110,96	46,48	75,24	70,41	114,72	66,59	–
Floretin	0,34	0,01	0,06	0,03	0,62	0,01	0,61	0,02	0,82	0,01	–
Kys. chlorogenová	0,73	0,74	4,97	9,08	0,36	0,42	0,53	0,23	0,6	0,04	–
Rutin	0,13	0,2	0,17	0,14	0,37	0,16	0,77	0,04	0,05	0,16	–
Kvercitrin	6,08	2,58	3,44	3,95	4,81	2,16	14,3	2,39	5,9	3,33	–
Katechin	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Epikatechin	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Celkem	167,57	72,72	157	98,36	117,12	49,23	91,45	73,09	122,09	70,13	–

*Koncentrace u plodů je z důvodu nízké koncentrace v mg/g uvedena v µg/g

Graf 8: Fenolické látky v odrůdě 'Lady Silvia' v mg/g



*Koncentrace fenolických látek v plodech je v porovnání s ostatním měřeným materiálem velmi nízká, proto není v grafu patrná.

Z této tabulky vyplývá velké zastoupení fenolických látek v období břez-en-duben v listí a pupenech. Oproti jiným odrůdám je u 'Lady Silvia' vyšší obsah kyseliny chlorogenové v květech a pupenech. Výraznější je také obsah kvercitrinu v listí v období měsíce srpen. U této odrůdy nejsou k dispozici údaje o množství fenolických látek v plodech.

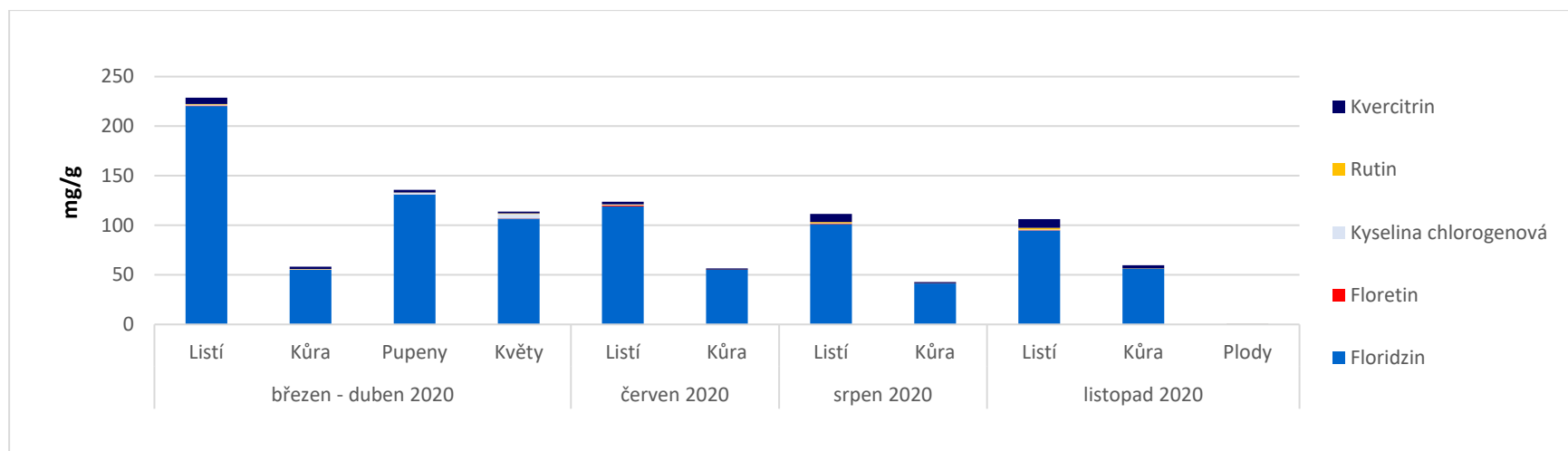
6.1.9 'Rubinstep'

Tabulka 14: Koncentrace (v mg/g a v µg/g u plodů) fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Rubinstep'

'Rubinstep'	břez-en-duben 2020				červen 2020		srpen 2020		listopad 2020		
	Listí	Kůra	Pupeny	Květy	Listí	Kůra	Listí	Kůra	Listí	Kůra	Plody
Floridzin	220,3	55,07	131,15	106,88	119,09	55,07	101,28	41,25	94,67	56,12	3,10
Floretin	0,64	0,01	0,03	0,03	0,8	0,02	0,47	0,01	0,46	0	–
Kys. chlorogenová	0,69	0,66	1,91	4,72	0,61	0,25	0,44	0,21	0,64	0,05	2,44
Rutin	0,82	0,14	0,09	0,45	0,7	0,09	1,1	0,07	1,57	0,32	1,19
Kvercitrin	6,4	2,48	2,67	1,6	2,71	0,94	8,33	1,17	8,8	3,33	3,35
Katechin	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0,20
Epikatechin	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	7,24
Celkem	228,85	58,36	135,85	113,68	123,91	56,37	111,62	42,71	106,14	59,82	17,52

*Koncentrace u plodů je z důvodu nízké koncentrace v mg/g uvedena v µg/g

Graf 9: Fenolické látky v odrůdě 'Rubinstep'



*Koncentrace fenolických látek v plodech je v porovnání s ostatním měřeným materiálem velmi nízká, proto není v grafu patrná.

V odrůdě 'Rubinstep' výrazně převládá zastoupení floridzinu v listech v období března-dubna (v ostatních třech měřeních (červen-listopad) je jeho zastoupení v listech zhruba o 50 % menší). V období měsíce srpen a listopad je o něco výraznější zastoupení rutinu a kvercitrinu v listech oproti ostatním materiálům. V plodech bylo nízké zastoupení všech fenolických látek a žádná látka výrazně nepřevažovala ostatní.

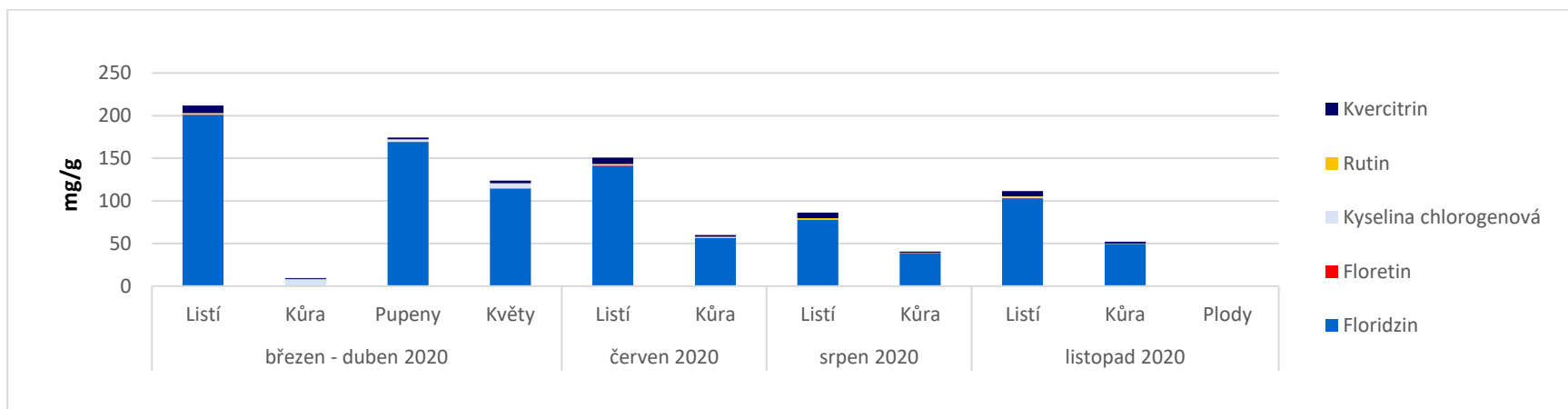
6.1.10 'Rubin'

Tabulka 15: Koncentrace (v mg/g a v µg/g u plodů) fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Rubin'

'Rubin'	Březen-duben 2020				Červen 2020		Srpen 2020		listopad 2020		
	Listí	Kůra	Pupeny	Květy	Listí	Kůra	Listí	Kůra	Listí	Kůra	Plody
Floridzin	200,74	0,94	169,03	114,64	141,31	56,5	77,64	38,95	103,07	49,73	4,86
Floretin	0,46	0	0,11	0,04	0,43	0,01	0,27	0,01	0,5	0	–
Kys. chlorogenová	0,7	6,3	2,89	5,61	0,7	1,19	0,61	0,06	0,97	0,04	8,45
Rutin	1,08	1,34	0,17	0,35	0,81	0,2	1,28	0,08	0,78	0,21	0,89
Kvercitrin	8,71	0,8	2,03	3,01	7,47	2,08	6,52	1,51	6,15	2,21	18,32
Katechin	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0,92
Epikatechin	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	11,70
Celkem	211,69	9,38	174,23	123,65	150,72	59,98	86,32	40,61	111,47	52,19	45,14

*Koncentrace u plodů je z důvodu nízké koncentrace v mg/g uvedena v µg/g

Graf 10: Fenolické látky v odrůdě 'Rubin' v mg/g



*Koncentrace fenolických látek v plodech je v porovnání s ostatním měřeným materiálem velmi nízká, proto není v grafu patrná.

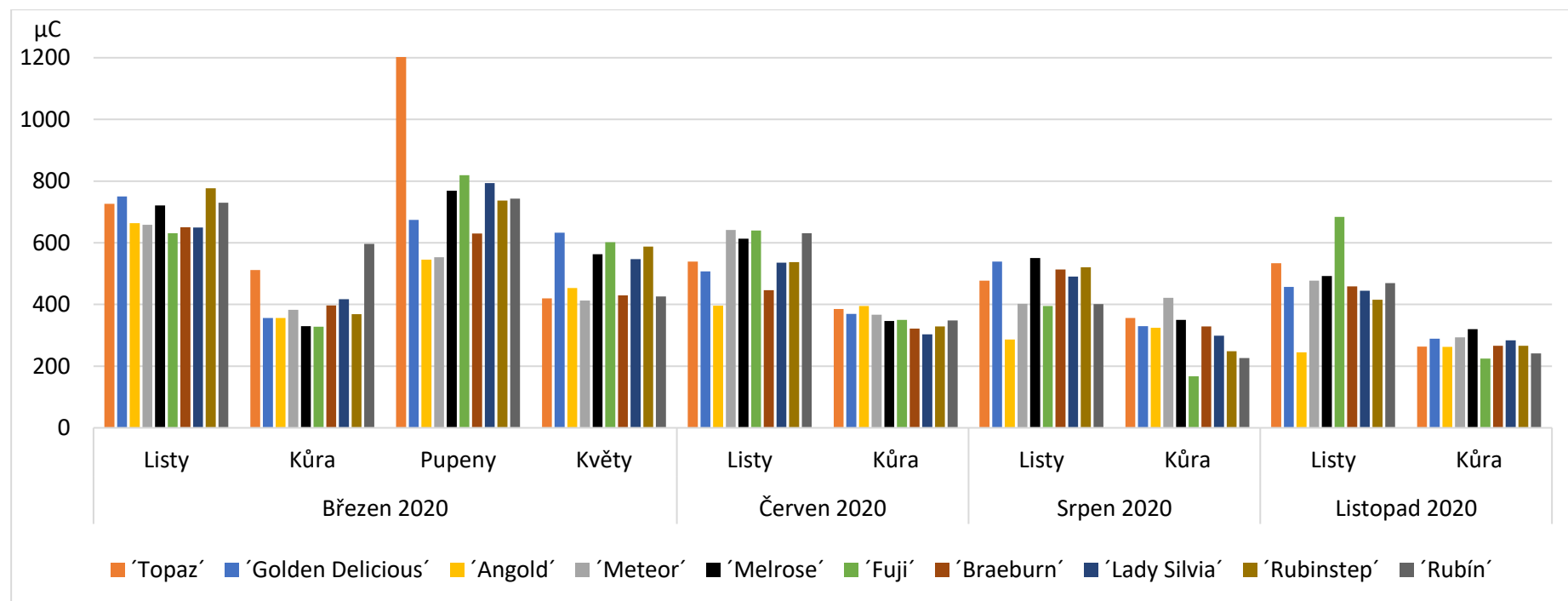
Z tabulky a grafu vyplývá, že nejvyšší obsah fenolických látek byl u všech vegetačních období v listech. Ve všech vzorcích převládá floridzin, kromě kůry v období března-dubna, kdy byly naměřené velmi malé hodnoty této látky. V plodech byl nejvíce zastoupený kvercitrin.

6.2 Celková antioxidační aktivita

Tabulka 16: Celková antioxidační aktivita v μC

Odrůda	Březen 2020				Červen 2020		Srpen 2020		Listopad 2020	
	Listy	Kůra	Pupeny	Květy	Listí	Kůra	Listí	Kůra	Listí	Kůra
´Topaz´	725,93	511,77	1232,30	419,47	539,30	385,53	476,90	355,83	533,68	263,48
´Golden Delicious´	750,10	355,80	674,27	632,50	507,20	369,10	539,45	329,37	457,17	289,17
´Angold´	663,50	355,87	545,00	453,53	396,17	394,83	286,58	324,07	244,95	262,58
´Meteor´	658,67	382,90	552,90	412,70	641,40	366,47	402,47	421,22	477,08	293,60
´Melrose´	720,93	329,83	768,80	562,47	613,20	346,53	550,52	349,77	492,23	319,50
´Fuji´	630,70	327,63	818,90	601,43	640,20	350,10	395,35	167,52	683,93	224,85
´Braeburn´	650,20	397,23	630,33	429,57	445,83	321,57	513,05	329,15	458,85	266,05
´Lady Silvia´	649,10	416,70	793,63	546,90	535,10	303,27	490,07	299,07	444,48	284,05
´Rubinstep´	777,10	368,27	736,73	587,50	537,27	329,17	520,55	248,67	415,22	266,28
´Rubin´	730,27	596,87	742,83	425,93	630,57	348,57	401,23	226,47	469,58	241,63
Štěpka	339,33									

Graf 11: Celková antioxidační aktivita v μC



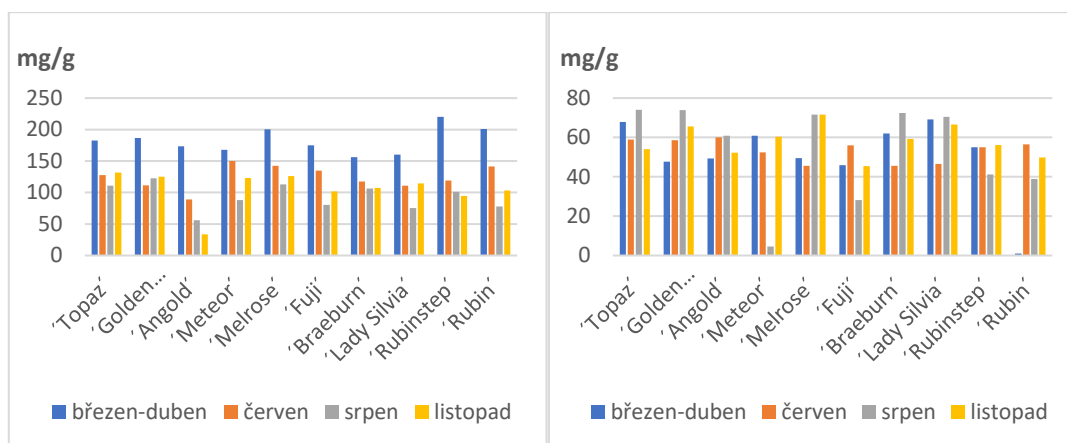
Celková antioxidační aktivita (TAA) byla nejvyšší v jarním období 'březen 2020' ve vzorku pupenů v odrůdě 'Topaz'. Nejnižší TTA byla v kůře. U listů se TTA pohybovala v rozmezí 244,95 - 777,10 μC , u kůry 167,52 – 596,87 μC , u pupenů 552,90 – 1232,30 μC a u květů 412,70 - 632,50 μC .

6.3 Zastoupení fenolických látek v jednotlivých odrůdách

U všech odrůd i všech vegetačních obdobích můžeme pozorovat největší množství floridzinu. Ostatní fenolické látky jsou zastoupeny výrazně méně. V následujících grafech budou zobrazeny jednotlivé fenolické látky ve všech materiálech a odrůdách.

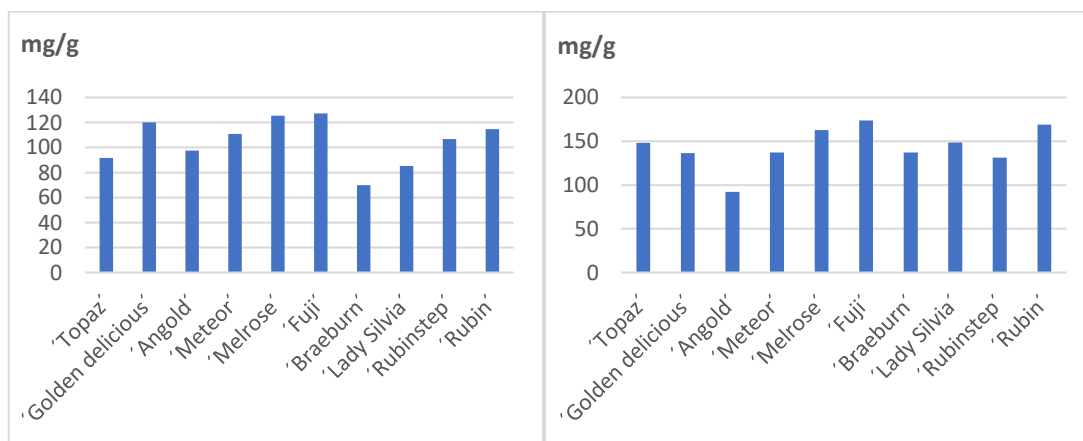
6.3.1 Floridzin

Graf 12: Zastoupení floridzinu v listí (levý graf) a kůře (pravý graf) u jednotlivých odrůd



V listech bylo obsaženo nejvíce floridzinu v období března-dubna v odrůdě 'Rubinstep'. Dále byl v tomto období nejvíce zastoupen v odrůdě 'Rubin' a 'Melrose'. V kůře byl floridzin nejvíce zastoupen u odrůdy 'Topaz' v měsíci srpna. Následovala odrůda 'Golden Delicious' a 'Braeburn' ve stejném vegetačním období.

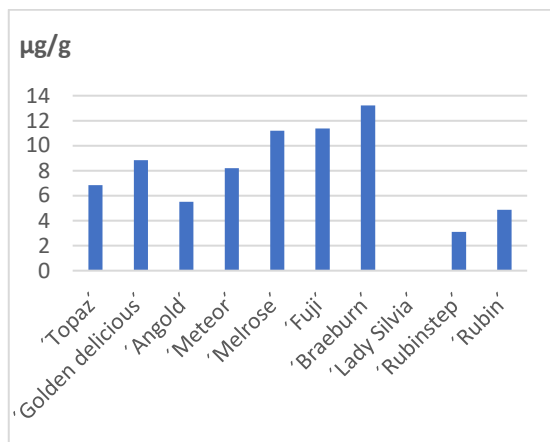
Graf 13: Zastoupení floridzinu v květech (levý graf) a pupenech (pravý graf) u jednotlivých odrůd



V období března-dubna byly navíc fenolické látky měřeny i v květech a pupenech. V květech bylo největší zastoupení floridzinu u odrůdy 'Fuji', dále v odrůdě 'Melrose'.

a 'Golden Delicious'. V pupenech bylo opět největší zastoupení v odrůdě 'Fuji', dále v odrůdě 'Rubin' a 'Melrose'.

Graf 14: Zastoupení floridzinu v plodech u jednotlivých odrůd

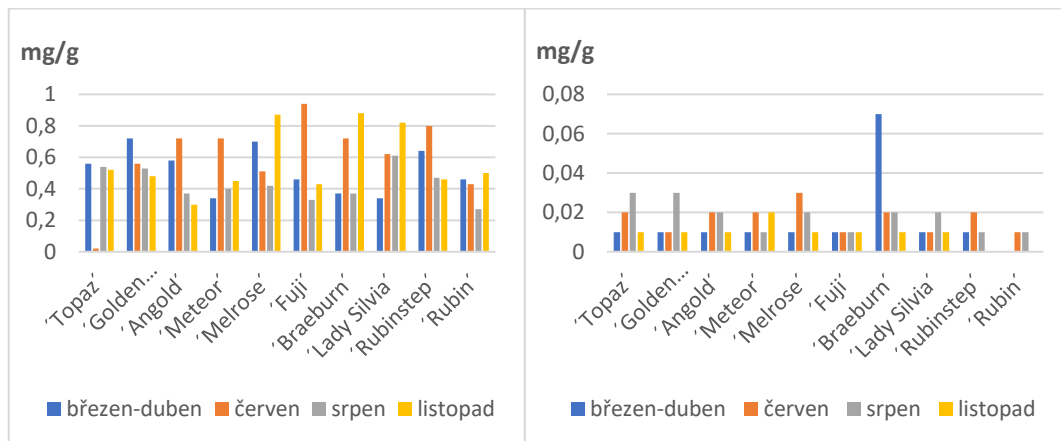


V plodech bylo největší zastoupení floridzinu v odrůdě 'Braeburn', dále bylo největší zastoupení v odrůdách 'Fuji' a 'Melrose'.

Celkově největší obsah floridzinu ze všech vegetačních období a ze všech materiálů je obsažen v odrůdě 'Rubinstep' v listí v období břez-en-duben.

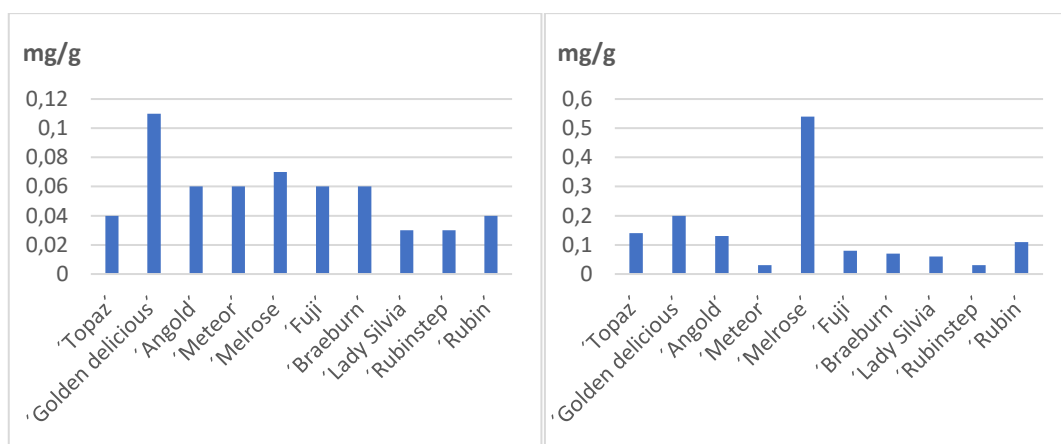
6.3.2 Floretin

Graf 15: Zastoupení floretinu v listí (levý graf) a kůře (pravý graf) u jednotlivých odrůd



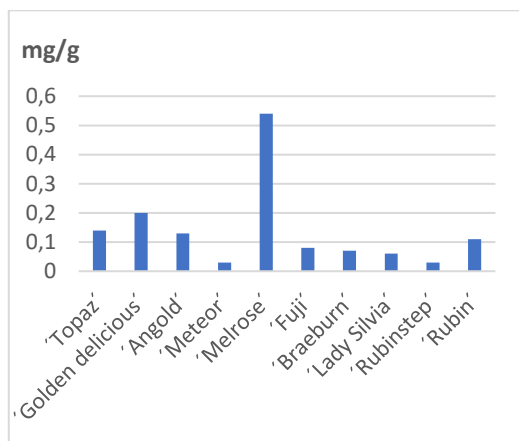
V listech bylo obsaženo nejvíce floretinu v období červen v odrůdě 'Fuji'. Dále byl floretin nejvíce zastoupen v období listopad v odrůdě 'Braeburn' a 'Melrose'. V kůře byl floretin nejvíce zastoupen u odrůdy 'Braeburn' v období břez-en-duben. Následovala odrůda 'Golden Delicious' a 'Topaz' v měsíci srpen a 'Melrose' v měsíci červen.

Graf 16: Zastoupení floretinu v květech (levý graf) a pupenech (pravý graf) u jednotlivých odrůd



V květech bylo největší zastoupení floretinu u odrůdy 'Golden Delicious' a 'Melrose'. V pupenech bylo největší zastoupení v odrůdě 'Melrose', dále v odrůdě 'Golden Delicious' a 'Topaz'.

Graf 17: Zastoupení floretinu v plodech u jednotlivých odrůd

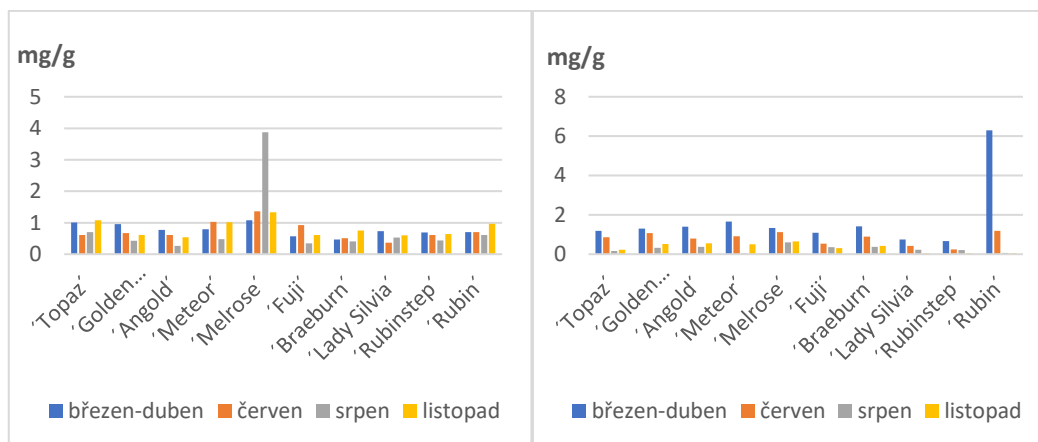


V plodech bylo největší zastoupení floretinu v odrůdě 'Melrose', dále v odrůdě 'Golden Delicious' a 'Topaz'.

Celkově největší obsah floretinu ze všech vegetačních období a ze všech materiálů je obsažen v odrůdě 'Fuji' v listí v měsíci červen.

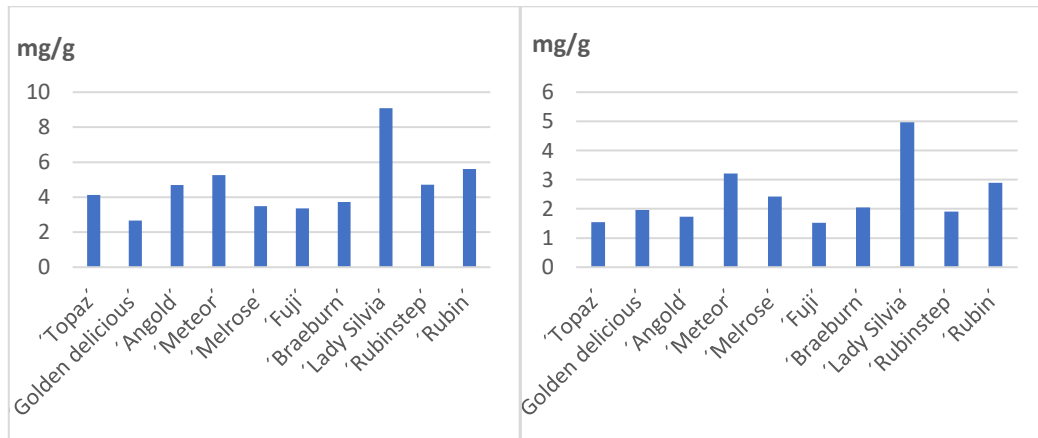
6.3.3 Kyselina chlorogenová

Graf 18: Zastoupení kyseliny chlorogenové v listí (levý graf) a kůře (pravý graf) u jednotlivých odrůd



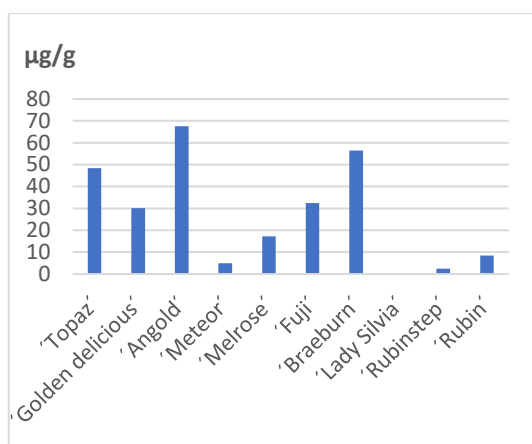
V listech byla kyselina chlorogenová nejvíce zastoupena ve všech vegetačních obdobích v odrůdě 'Melrose'. Nejvíce zde byla zastoupena v měsíci srpen. V kůře byla kyselina chlorogenová nejvíce zastoupena u odrůdy 'Rubin' v období března-dubna. Následovala odrůda 'Meteor' a 'Braeburn' také v období března-dubna.

Graf 19: Zastoupení kyseliny chlorogenové v květech (levý graf) a v pupenech (pravý graf) u jednotlivých odrůd



V květech bylo největší zastoupení kyseliny chlorogenové u odrůdy 'Lady Silvia', dále v odrůdě 'Rubin' a 'Meteor'. V pupenech bylo největší zastoupení také v odrůdě 'Lady Silvia', dále v odrůdě 'Meteor' a 'Rubin'.

Graf 20: Zastoupení kyseliny chlorogenové v plodech u jednotlivých odrůd

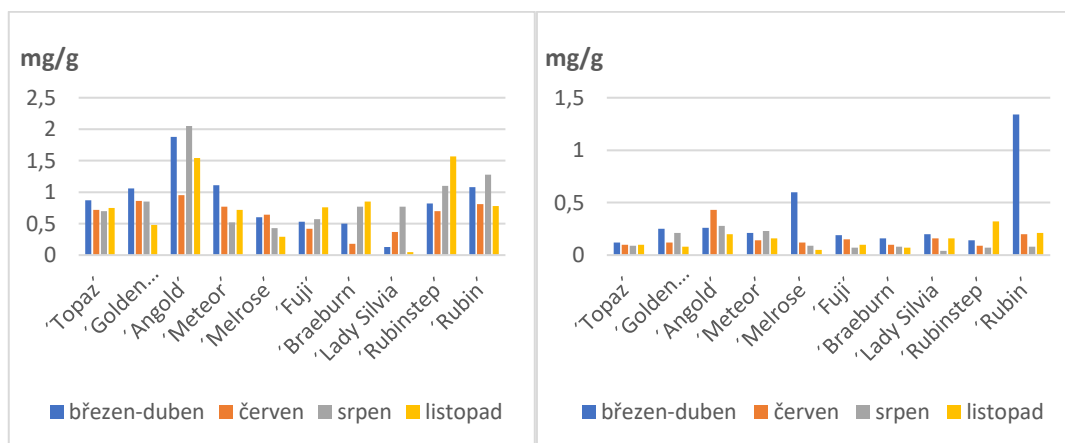


V plodech bylo největší zastoupení kyseliny chlorogenové v odrůdě 'Angold', dále v odrůdě 'Braeburn' a 'Topaz'.

Celkově největší obsah kyseliny chlorogenové ze všech vegetačních období a ze všech materiálů je obsažen v odrůdě 'Lady Silvia' v květech v měsíci březen-duben.

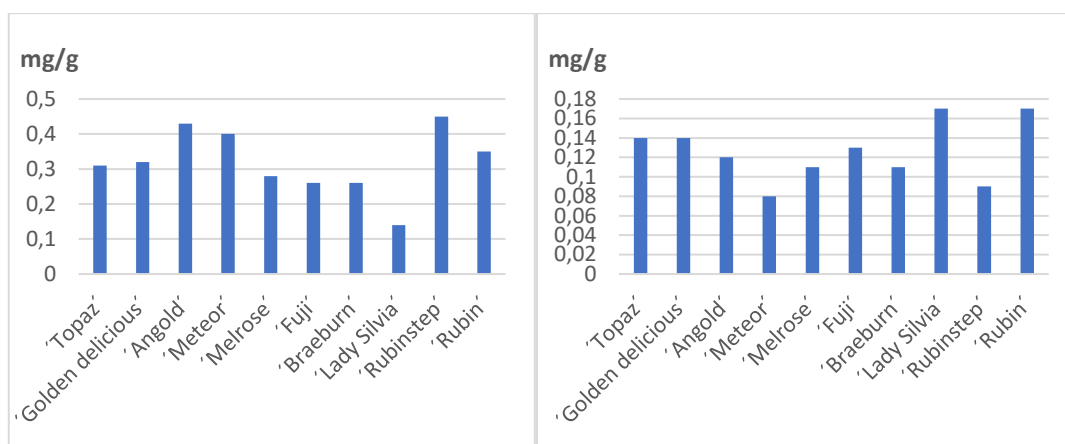
6.3.4 Rutin

Graf 21: Zastoupení rutinu v listech (levý graf) a kůře (pravý graf) u jednotlivých odrůd



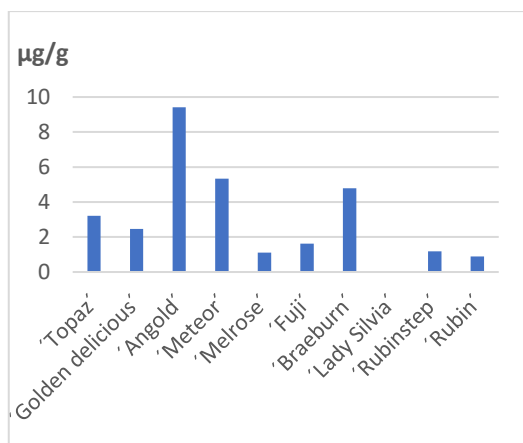
V listech bylo obsaženo nejvíce rutinu v odrůdě 'Angold' v měsíci srpen a dále v období březen-duben. V kůře byl rutin nejvíce zastoupen u odrůdy 'Rubin' v období březen-duben. Následovala odrůda 'Melrose' z období březen-duben a 'Angold' v období červen.

Graf 22: Zastoupení rutinu v květech (levý graf) a v pupenech (pravý graf) u jednotlivých odrůd



V květech bylo největší zastoupení rutinu u odrůdy 'Rubinstep', dále v odrůdě 'Angold' a 'Meteor'. V pupenech bylo největší zastoupení v odrůdě 'Lady Silvia' a 'Rubin'.

Graf 23: Zastoupení rutinu v plodech u jednotlivých odrůd

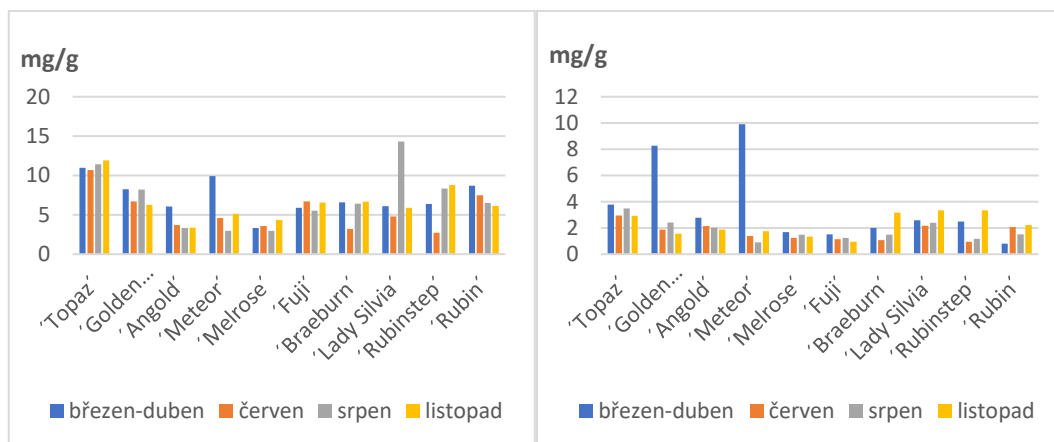


V plodech bylo největší zastoupení v odrůdě 'Angold', dále v odrůdě 'Meteor' a 'Braeburn'.

Celkově největší obsah rutinu ze všech vegetačních období a ze všech materiálů je obsažen v odrůdě 'Angold' v listech v měsíci srpen.

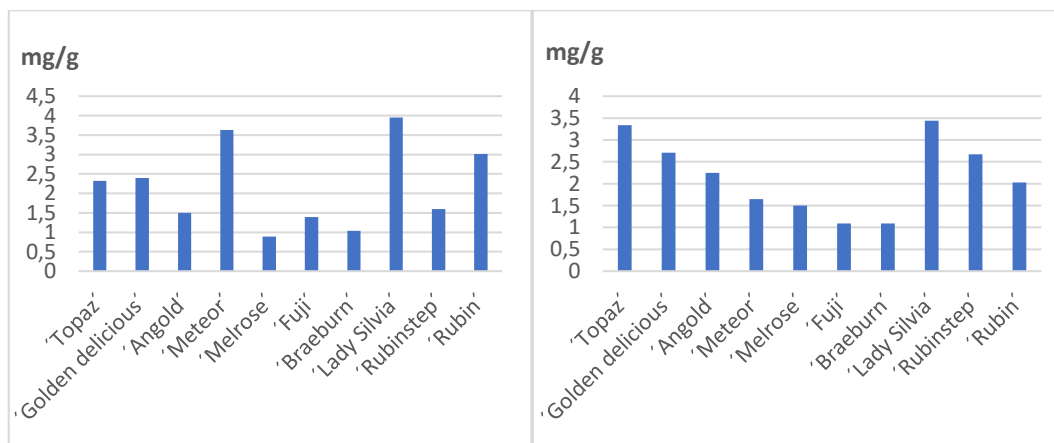
6.3.5 Kvercitrin

Graf 24: Zastoupení kvercitrinu v listech (levý graf) a v kůře (pravý graf) u jednotlivých odrůd



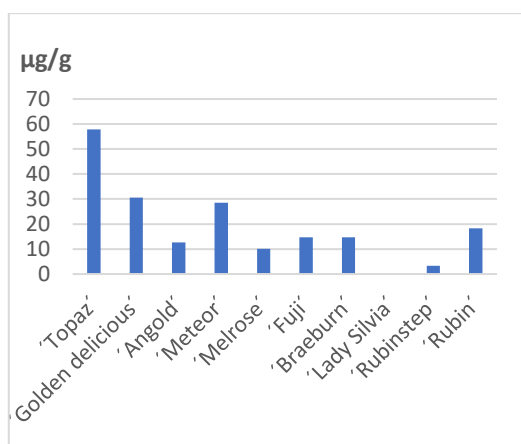
V listech bylo obsaženo nejvíce kvercitrinu v období srpen v odrůdě 'Lady Silvia'. Dále byl kvercitrin nejvíce zastoupen v období listopad v odrůdě 'Topaz'. V kůře byl kvercitrin nejvíce zastoupen u odrůdy 'Meteor' v období březen-duben. Následovala odrůda 'Golden Delicious' a 'Topaz'.

Graf 25: Zastoupení kvercitrinu v květech (levý graf) a v pupenech (pravý graf) u jednotlivých odrůd



V květech bylo největší zastoupení kvercitrinu u odrůdy 'Lady Silvia' a 'Meteor'. V pupenech bylo největší zastoupení v odrůdě 'Lady Silvia', dále v odrůdě 'Topaz' a 'Golden Delicious'.

Graf 26: Zastoupení kvercitrinu v plodech u jednotlivých odrůd



V plodech bylo největší zastoupení kvercitrinu u odrůdy 'Topaz', dále u 'Golden Delicious' a 'Meteor'.

Celkově největší obsah kvercitrinu ze všech vegetačních období a ze všech materiálů je obsažen v odrůdě 'Lady Silvia' v listí v měsíci srpen.

6.4 Obsah fenolických látek ve starých odrůdách

Tabulka 17: Koncentrace fenolických látek ve vzorku odrůdy 'Šampaňská reneta' v mg/g

'Šampaňská reneta'	mg/g
	Listí
Floridzin	146,38
Floretin	0,71
Kyselina chlorogenová	0,72
Rutin	0,36
Kvercitrin	4,12
Celkem	152,29

Tabulka 18: Koncentrace fenolických látek ve vzorku odrůdy 'Jadernička moravská' v mg/g

'Jadernička moravská'	mg/g
	Listí
Floridzin	139,85
Floretin	0,87
Kyselina chlorogenová	0,77
Rutin	1,82
Kvercitrin	5,82
Celkem	149,13

Tabulka 19: Koncentrace fenolických látek ve vzorku odrůdy 'Holovouské malinové' v mg/g

'Holovouské malinové'	mg/g
	Listí
Floridzin	128,97
Floretin	0,36
Kyselina chlorogenová	0,87
Rutin	1,08
Kvercitrin	8,6
Celkem	139,88

Ze starých odrůd obsahovala nejvíce fenolických látek odrůda 'Šampaňská reneta' a i tato odrůda obsahovala nejvíce floridzinu.

6.5 Obsah fenolických látek ve vzorku štěpky

Tabulka 20: Koncentrace fenolických látek ve vzorku štěpky v mg/g

ŠTĚPKA	mg/g
Floridzin	48,42
Floretin	0,03
Kyselina chlorogenová	0,63
Rutin	0,07
Kvercitrin	1,58
Celkem	50,73

Ve vzorku štěpky nebylo zastoupení fenolických látek příliš velké ve srovnání s listy, pupeny či květy. Srovnatelné ale bylo se vzorky kůry. Z fenolických látek byl zde opět nejvíce zastoupen floridzin. Následoval kvercitrin, kyselina chlorogenová, rutin a nejméně bylo obsaženo floretinu. Nižší obsah fenolických látek ve vzorcích štěpky je pravděpodobně způsoben vyšším podílem obsahu dřeva ve štěpce, kde jsou obecně koncentrace fenolických látek menší.

6.6 Celkové zhodnocení

Ze všech stanovovaných odrůd bylo nejvyšší množství fenolických látek v odpadních produktech jabloní v listech v období březen-duben (odrůda 'Rubinstep'), nejnižší množství bylo naměřeno v kůře (odrůda 'Meteor'). Celkové množství

fenolických látek se u listů pohybovalo v rozmezí 39,17 – 228,85 mg/g, u kůry 5,75 – 77,85 mg/g, u pupenů 96,57 - 176,45 mg/g, u květů 74,91 – 132,43 mg/g a u štěpky 50,73 mg/g. Z fenolických látek byl nejvíce zastoupen floridzin. Množství fenolických látek v plodech bylo oproti listům, kůře, pupenům i květům velmi malé. V plodech byly hodnoty uváděny v $\mu\text{g/g}$, zatímco u ostatních stanovovaných materiálů to bylo v mg/g. Lze říct, že floridzin v plodech již není dominantní složkou. Podle tabulek a grafů vyplývá, že u plodů jsou nejvíce zastoupeny látky: kyselina chlorogenová, kvercitrin a epikatechin.

7 Závěr a diskuse

Tato diplomová práce se zabývala sledováním profilu fenolických látek v různých částech jabloní. Sledovaným materiálem byly pupeny, květy, listí, kůra a štěpka. Mezi stanovované fenolické látky patřily floridzin, floretin, rutin, kvercitrin a kyselina chlorogenová. Analýza se prováděla u deseti různých odrůd, kterými jsou 'Topaz', 'Golden Delicious', 'Angold', 'Meteor', 'Melrose', 'Fuji', 'Braeburn', 'Lady Silvia', 'Rubinstep' a 'Rubin' ve čtyřech obdobích, a to březen-duben 2020, červen 2020, srpen 2020 a listopad 2020. V období červen 2020 byl navíc sledován obsah fenolických látek v listí u tří starších odrůd: 'Šampaňská reneta', 'Jadernička moravská', 'Holovouské malinové'. Získané extrakty byly také použity pro změření celkové antioxidační aktivity.

Ke stanovení fenolických látek byla použita již vyvinutá a validovaná metoda HPLC s DAD detekcí. Pro separaci jednotlivých analytů byla zvolena kolona YMC - Triart C18 ExRS (150 × 4,6 mm × 5 μm, 8 nm). Byla zvolena gradientová eluce s mobilní fází, která byla tvořena acetonitrilem jako organickou složkou a vodnou složkou s kyselinou fosforečnou (pH = 2,2). Celková doba analýzy byla 12,51 minut. Mezi stanovované fenolické látky patřily floridzin, floretin, kyselina chlorogenová, rutin a kvercitrin. Teplota kolonového prostoru byla nastavena na 30 °C a průtoková rychlost byla 1 ml/min.

Podle tohoto výzkumu je patrné, že vegetační období, typ odrůdy a druh materiálu mají významný vliv na obsah fenolických látek. Nejvyšší záchyt fenolických látek byl zaznamenán v jarním období a nejbohatším materiálem bylo listí, což je v souladu s diplomovou prací, která se zabývala stanovením fenolických látek v různých obdobích v hrušni [82].

V jarním období byla u 10 odrůd zjištěna koncentrace fenolických látek v rozmezí 164,25 mg/g - 228,85 mg/g v listech, 48,76 mg/g - 73,01 mg/g v kůře, 96,57 mg/g - 176,45 mg/g v pupenech a 74,91 mg/g - 132,43 mg/g v květech. V tomto období byla zjištěna i nejvyšší celková antioxidační aktivita. S jistotou lze říct, že majoritní fenolickou látkou byl ve všech případech floridzin. Nejvíce bohatou odrůdou z hlediska fenolických látek je selektována odrůda 'Rubinstep', ta vykazuje i vysokou antioxidační aktivitu a má tedy i nejvyšší zdravotní potenciál při zpracování rostlinného materiálu. Rovněž směsný vzorek štěpky obsahuje nezanedbatelné množství fenolických látek (50,73 mg/g).

U odrůdy 'Rubinstep' v jarním období bylo celkem naměřeno 228,85 mg/g fenolických látek a převážnou část tvořil floridzin – 220,3 mg/g. Kůra obsahovala 58,36 mg/g, pupeny 135,85 mg/g, květy 113,68 mg/g a plody jen 17,52 µg/g.

V období červen 2020 byly moderní odrůdy jabloní porovnány i se třemi staršími odrůdami - 'Šampaňská reneta' (152,29 mg/g), 'Jadernička moravská' (149,13 mg/g) a 'Holovouské malinové' (139,88 mg/g). Rovněž tyto odrůdy jsou fenolickými látkami bohatě zastoupené.

Biomasa z ovocných stromů představuje doposud nevyužívaný zemědělský materiál. Z výsledků diplomové práce je zřejmé, že tento materiál je bohatě zastoupen fenolickými látkami a po celé vegetační období snadno dostupný produkt. Především se jedná o listí, jehož sběr a úprava nezasahuje do životního cyklu stromů. Také příprava vzorků na následnou analýzu není značně časově ani finančně náročná a jejich stanovení se provádí pomocí dostupných analytických metod. Vzhledem k prospěšným vlastnostem fenolických látek je vhodné se zaměřit na další výzkumy, které by pomohly s vývojem doplňků stravy a léčiv na různá méně či více závažná onemocnění.

V listí nejvíce zastoupená fenolická látka floridzin je často zkoumán pro jeho účinky na lidské zdraví. Tento přírodní nevyužívaný zdroj s vysokou antioxidační aktivitou má podle výzkumů zmíněných v této diplomové práci dobré výsledky po podávání testovaným zvířatům. Floridzin má vliv na prevenci obezity, steatózy jater, inzulinové rezistence, či snížení postprandiální hyperglykémie. Tato látka má potenciál stát se součástí doplňků stravy či léčiv. Byly by přínosné další studie zabývající se například extrakcí horkou vodou s využitím pro přípravu čajů ze sušených lístků.

8 Seznam tabulek

Tabulka 1: Farmakologické účinky floridzinu [23]	16
Tabulka 2: Farmakologické účinky rutinu [37, 41].....	19
Tabulka 3: Přehled separačních podmínek v předchozích studiích	29
Tabulka 4: Podmínky analýzy	34
Tabulka 5: Retenční časy standardů.....	36
Tabulka 6: Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Topaz'	37
Tabulka 7: Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Golden Delicious'	39
Tabulka 8: Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Angold'	40
Tabulka 9: Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Meteor'	42
Tabulka 10: Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Melrose'	43
Tabulka 11: Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Fuji'	45
Tabulka 12: Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Braeburn'	46
Tabulka 13: Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Lady Silvia'	48
Tabulka 14: Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Rubinstep'	49
Tabulka 15: Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Rubin'	51
Tabulka 16: Celková antioxidační aktivita v μC	52
Tabulka 17: Koncentrace fenolických látek v odrůdě 'Šampaňská reneta' v mg/g.....	61
Tabulka 18: Koncentrace fenolických látek v odrůdě 'Jadernička moravská' v mg/g.	61
Tabulka 19: Koncentrace fenolických látek v odrůdě 'Holovouské malinové' v mg/g	62
Tabulka 20: Koncentrace fenolických látek ve vzorku štěpky v mg/g	62

9 Seznam obrázků

Obrázek 1: Strukturní vzorec floridzinu [17]	14
Obrázek 2: Strukturní vzorec floretinu [17]	17
Obrázek 3: Strukturní vzorec rutinu [17]	18
Obrázek 4: Strukturní vzorec kvercitrinu [17]	20
Obrázek 5: Strukturní vzorec kyseliny chlorogenové [17]	21
Obrázek 6: Ukázka produktu ELANCYL Slim Design [57, 58]	22
Obrázek 7: Ukázka produktu LifeExtension [59]	22
Obrázek 8: Ukázka produktu Phloridzin Pure [60]	23
Obrázek 9: Ukázka produktu Green Apple 10:1 [61]	23
Obrázek 10: Ukázka doplňků stravy s kyselinou chlorogenovou a rutinem [64, 65] ...	24
Obrázek 11: Jednotlivé komponenty kapalinového chromatografu [69]	26
Obrázek 12: Porovnání kolon Triart C18 a Triart C18 ExRS [73]	27
Obrázek 13: Chromatogramy směsi standardů z období březen-duben.....	35
Obrázek 14: Chromatogramy vzorku listů odrůdy 'Topaz' z měsíce srpen	35

10 Seznam grafů

Graf 1: Fenolické látky v odrůdě 'Topaz' v mg/g	38
Graf 2: Fenolické látky v odrůdě 'Golden Delicious' v mg/g	39
Graf 3: Fenolické látky v odrůdě 'Angold' v mg/g	41
Graf 4: Fenolické látky v odrůdě 'Meteor' v mg/g.....	42
Graf 5: Fenolické látky v odrůdě 'Melrose' v mg/g	44
Graf 6: Fenolické látky v odrůdě 'Fuji' v mg/g.....	45
Graf 7: Fenolické látky v odrůdě 'Braeburn' v mg/g	47
Graf 8: Fenolické látky v odrůdě 'Lady Silvia' v mg/g.....	48
Graf 9: Fenolické látky v odrůdě 'Rubinstep'	50
Graf 10: Fenolické látky v odrůdě 'Rubin' v mg/g	51
Graf 11: Celková antioxidační aktivita v μC	53
Graf 12: Zastoupení floridzinu v listí a kůře u jednotlivých odrůd	54
Graf 13: Zastoupení floridzinu v květech a pupenech u jednotlivých odrůd	54
Graf 14: Zastoupení floridzinu v plodech u jednotlivých odrůd	55
Graf 15: Zastoupení floretinu v listí a kůře u jednotlivých odrůd	55
Graf 16: Zastoupení floretinu v květech a pupenech u jednotlivých odrůd	56
Graf 17: Zastoupení floretinu v plodech u jednotlivých odrůd	56
Graf 18: Zastoupení kyseliny chlorogenové v listí a kůře u jednotlivých odrůd.....	57
Graf 19: Zastoupení kyseliny chlorogenové v květech a pupenech u jednotlivých odrůd	57
Graf 20: Zastoupení kyseliny chlorogenové v plodech u jednotlivých odrůd.....	58
Graf 21: Zastoupení rutinu v listech a kůře u jednotlivých odrůd.....	58
Graf 22: Zastoupení rutinu v květech a v pupenech u jednotlivých odrůd.....	59
Graf 23: Zastoupení rutinu v plodech u jednotlivých odrůd.....	59
Graf 24: Zastoupení kvercitrinu v listech a v kůře u jednotlivých odrůd	60
Graf 25: Zastoupení kvercitrinu v květech a v pupenech u jednotlivých odrůd	60
Graf 26: Zastoupení kvercitrinu v plodech u jednotlivých odrůd.....	61

11 Použitá literatura

- [1] Ovocné sady (strukturální šetření), 2017. Český statistický úřad [online]. [cit. 2021-03-25]. Dostupné z: <https://www.czso.cz/csu/czso/statistiky>
- [2] Patočka, J., Bhardwaj, K., Klimova, B., Nepovimova, E., Wu, Q., Landi, M., Kuca, K., Valis, M., Wu, W. *Malus domestica*: A Review on Nutritional Features, Chemical Composition, Traditional and Medicinal Value. *Plants* 2020, 9, 1408. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/plants9111408>
- [3] Liaudanskas, M., Viškelis, P., Raudonis, R., Kviklys, D., Uselis, N., Janulis, V. Phenolic composition and antioxidant activity of *Malus domestica* leaves. *The Scientific World Journal*, 2014, 306217. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2014/306217>
- [4] Bílková, A. a kol. Metodika stanovení hlavních fenolických sloučenin v genotypech jabloní s ohledem na různé podmínky skladování, 2018. Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o., ISBN 978-80-87030-68-4.
- [5] Vuolo, M. M., Verena, S. L., Maróstica, R. M. Phenolic Compounds: Structure, Classification, and Antioxidant Power. Elsevier, 2019, 33-50. ISBN 9780128147740. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-814774-0.00002-5
- [6] Othman, S. B., Kaldmäe, H., Rätsep, R., Bleive, U., Aluvee, A., Rincken, T. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Phloretin and Other Phenolic Compounds from Apple Tree Leaves (*Malus domestica* Borkh.) and Comparison of Different Cultivars from Estonia. 2021, 10(2). ISSN 2076-3921. Dostupné z: doi:10.3390/antiox10020189
- [7] Ho, Ch-T. Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health II. Washington, DC: American Chemical Society, 1992, 2-7. ACS Symposium Series. ISBN 9780841224766. Dostupné z: doi:10.1021/bk-1992-0507.ch001
- [8] Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191–203. Dostupné z: 10.1016/j.foodchem.2005.07.042

- [9] Salucci, S., Falcieri, E. Polyphenols and their potential role in preventing skeletal muscle atrophy. *Nutrition Research*. 2020, 74, 10-22. ISSN 02715317. Dostupné z: doi.org/10.1016/j.nutres.2019.11.004
- [10] Starowicz, M., Piskula, M., Achremowicz, B., Zieliński, H. Phenolic Compounds from Apples: Reviewing their Occurrence, Absorption, Bioavailability, Processing, and Antioxidant Activity – a Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 321-336. ISSN 1230-0322. Dostupné z: [doi:10.31883/pjfns/127635](https://doi.org/10.31883/pjfns/127635)
- [11] Liaudanskas, M., Viškelin, P., Jakštas, V., Raudonis, R., Kviklys, D., Milašius, A., Janulis, V. Application of an Optimized HPLC Method for the Detection of Various Phenolic Compounds in Apples from Lithuanian Cultivars. *Journal of Chemistry*. 2014, 2014, 1-10. ISSN 2090-9063. Dostupné z: [doi:10.1155/2014/542121](https://doi.org/10.1155/2014/542121)
- [12] Kschonsek, J., Wolfram, T., Stöckl, A., Böhm, V. Polyphenolic Compounds Analysis of Old and New Apple Cultivars and Contribution of Polyphenolic Profile to the In Vitro Antioxidant Capacity. *Antioxidants (Basel)*. 2018, 7 (1): 20. PMID 29364189. Dostupné z [doi: 10.3390/antiox7010020](https://doi.org/10.3390/antiox7010020)
- [13] Alberti, A., Zieliski, A. A. F., Couto, M., Judacewski, P., Mafra, L. I., Nogueira, A. Distribution of phenolic compounds and antioxidant capacity in apples tissues during ripening. *Journal of food science and technology*. 2017, 54(6): 1511-1518. Dostupné z [doi: 10.1007/s13197-017-2582-z](https://doi.org/10.1007/s13197-017-2582-z)
- [14] Yildirim, F., Yildirim, A. N., Dilmacunal, T., San, B., Ersoy, N. Composition of phenolic compounds in petal flowers and leaf samples of various apple cultivars. ISSN 2286-1580. 2017.
- [15] Wojdylo, A., Oszmiański, J., Laskowski, P. Polyphenolic Compounds and Antioxidant Activity of New and Old Apple Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008, 56(15), 6520-6530. ISSN 0021-8561. Dostupné z: [doi:10.1021/jf800510j](https://doi.org/10.1021/jf800510j)
- [16] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 6072, Phlorizin. [online]. [cit. 2021-03-25] Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Phlorizin>.

- [17] Sigma-Aldrich: Analytical, Biology, Chemistry & Materials Science products and services. Sigma-Aldrich [online]. Copyright © 2021 [cit. 2021-03-25]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/czech-republic.html>
- [18] Gosch C., Halbwirth H., Stich K. Phloridzin: biosynthesis, distribution and physiological relevance in plants. *Phytochemistry*. 2010 Jun;71(8-9):838-43. Dostupné z doi: 10.1016/j.phytochem.2010.03.003. PMID: 20356611.
- [19] Ehrenkranz, J. R. L., Lewis, N. G., Ronald Kahn, C., Roth, J., 2005. Phlorizin: a review. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 21(1), 31–38. Dostupné z doi:10.1002/dmrr.532
- [20] Spilková, J. a kol.: *Farmakognosie*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2016. s. 84. ISBN 978-80-246-3264-3
- [21] Jugdé, H., Nguy, D., Moller I., Cooney, J. M., Atkinson, R. G. Isolation and characterization of a novel glycosyltransferase that converts phloretin to phlorizin, a potent antioxidant in apple. *FEBS Journal* 275, 2008, 3804-3814. Dostupné z: doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06526.x
- [22] Francini, A., Sebastiani, L.: *Phenolic Compounds in Apple (Malus x domestica Borkh.): Compounds Characterization and Stability during Postharvest and after Processing*. *Antioxidants*, 2013, 2, 181-193
- [23] Tian, L.; Cao, J.; Zhao, T.; Liu, Y.; Khan, A.; Cheng, G. The Bioavailability, Extraction, Biosynthesis and Distribution of Natural Dihydrochalcone: Phloridzin. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 962. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms22020962>
- [24] Yuan, X., Wu, Y., Liang, J., et al. Phlorizin treatment attenuates obesity and related disorders through improving BAT thermogenesis. *Journal of Functional Foods*. 2016, 27, 429-438. ISSN 17564646. Dostupné z: doi:10.1016/j.jff.2016.09.022
- [25] Zhang X., Yi K., Chen J., Li R., Xie J., Jin Y., Mei X., Li Y., Liu G, Wang Z. Purified Phlorizin from *Docynla Indica* (Wall.) Decne by HSCCC, Compared with Whole Extract, Phlorizin and Non-Phlorizin Fragment Ameliorate Obesity, Insulin Resistance, and Improves Intestinal Barrier Function in High-Fat-Diet-Fed Mice. *Molecules*. 2018 Oct 19;23(10):2701. Dostupné z doi: 10.3390/molecules23102701. PMID: 30347741; PMCID: PMC6222664.

- [26] Shin, S., Cho, S., Jung, U., Ryu, R., Choi M. Phlorizin Supplementation Attenuates Obesity, Inflammation, and Hyperglycemia in Diet-Induced Obese Mice Fed a High-Fat Diet. *Nutrients*. 2016, 8(2). ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu8020092
- [27] Sun, Ch., Liu, Y., Zhan, L., Rayat, G., Xiao, J., Jiang, H., Li, X., Chen, K. Anti-diabetic effects of natural antioxidants from fruits, 2020. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2020.07.024
- [28] Makarova, E., Górnas, P., Konrade, I., Tirzite, D., Cirule, H., Gulbe, A., Dambrova, M., 2014. Acute anti-hyperglycaemic effects of an unripe apple preparation containing phlorizin in healthy volunteers: a preliminary study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(3), 560–568. Dostupné z doi:10.1002/jsfa.6779
- [29] Rossetti, L., Smith, D., Shulman, G.I., Papachristou, D., DeFronzo, R.A. Correction of hyperglycemia with phlorizin normalizes tissue sensitivity to insulin in diabetic rats. *J. Clin. Investig.* 1987, 79, 1510–1515.
- [30] Antika, L., Lee, E., Kim, Y., Kang, M., Park, S., Kim, D., Oh H, Choi Y., Kang Y. Dietary phlorizin enhances osteoblastogenic bone formation through enhancing β -catenin activity via GSK-3 β inhibition in a model of senile osteoporosis, 2017. Dostupné z doi: 10.1016/j.jnutbio.2017.07.014. PMID: 28866105.
- [31] Puel, C., Quintin, A., Mathey, J., Obled, C., Davicco, M.J., Lebecque, P., Kati-Coulibaly, S., Horcajada, M.N., Coxam, V. Prevention of bone loss by phloridzin, an apple polyphenol, in ovariectomized rats under inflammation conditions. *Calcif. Tissue Int.* 2005, 77, 311–318.
- [32] Londzin, P., Siudak, S., Cegiela, U., Pytlik, M., Janas, A., Waligora, A., Folwarczna, J. Phloridzin, an apple polyphenol, exerted unfavorable effects on bone and muscle in an experimental model of type 2 diabetes in rats. *Nutrients*, 2018, 10, 1701.
- [33] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 4788, Phloretin. [online]. [cit. 2021-03-25] Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Phloretin>.
- [34] Mariadoss, A.V.A., Vinyagam, R., Rajamanickam, V., Sankaran, V., Venkatesan, S., David, E. Pharmacological Aspects and Potential Use of Phloretin: A Systemic

- Review. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2019, 19(13), 1060-1067. ISSN 13895575. Dostupné z: doi:10.2174/1389557519666190311154425
- [35] Behzad, S., Sureda, A., Barreca, D., Nabavi, S.F., Rastrelli, L. Health effects of phloretin: from chemistry to medicine. *Phytochem Rev* 16, 527–53. 2017. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11101-017-9500-x>
- [36] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 5280805, Rutin. [online]. [cit. 2021-03-27] Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Rutin>.
- [37] Ganeshpurkar, A., Saluja, A.K. The Pharmacological Potential of Rutin. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2017, 25(2), 149-164. ISSN 13190164. Dostupné z: doi:10.1016/j.jsps.2016.04.025
- [38] Co Jsou To Flavonoly? Cibdol Swiss purity [online]. [cit. 2021-03-27]. Dostupné z: <https://www.cibdol.cz/cbd-encyklopedie/co-jsou-to-flavonoly>
- [39] Riaz, H., Raza, S., Aslam, M., Ahmad, M., Maria, P. An Updated Review of Pharmacological, Standardization Methods and Formulation Development of Rutin. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 2018, 12(1), 127-132. ISSN 09737510. Dostupné z: doi:10.22207/JPAM.12.1.16
- [40] Gullón, B., Lú-Chau, T. A., Moreira, M. T., Lema, J. M., Eibes, G. Rutin: A review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability. *Trends in Food Science & Technology*, 67, 220–235. doi:10.1016/j.tifs.2017.07.008
- [41] Al-Dhabi, N. A., Arasu, M. V., Park, C. H., Park, S. U. An up-to-date review of rutin and its biological and pharmacological activities. *EXCLI journal*, 2015, 14, 59–63. Dostupné z: <https://doi.org/10.17179/excli2014-663>
- [42] Choquenot, B., Couteau, C., Papisaris, E., Laurence L. J. M. Quercetin and Rutin as Potential Sunscreen Agents: Determination of Efficacy by an in Vitro Method. *Journal of Natural Products*, 2008, 71, 6, 1117-1118. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/np7007297>

- [43] Rahman, F., Tabrez, S., Ali, S., Alqahtani, A., Ahmed, M. Z., Rub, A. Molecular docking analysis of rutin reveals possible inhibition of SARS-CoV-2 vital proteins, *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, Volume 11, Issue 2, 2021, Pages 173-179, ISSN 2225-4110, <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2021.01.006>.
- [44] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 5280459, Quercitrin. [online]. [cit. 2021-03-27]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Quercitrin>.
- [45] Fabjan, N., Rode, J., Košir, I. J., Wang, Z., Zhang, Z., Kreft, I. Tartary Buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) as a Source of Dietary Rutin and Quercitrin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003, 51 (22), 6452-6455. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/jf034543e>
- [46] Sharma, A., Gupta, H. Quercetin-A Flavanoid. *Indian Journal of Pharmacology*. 2010, 1 (1), 10-15. Dostupné z: <https://ddtjournal.net/?view-pdf=1&embedded=true&article=ff728fcf9e2bab0a0d3ddeaffe6d1c1cF9pp9g%3D%3D>
- [47] Tang, J., Diao, P., Shu, X., Li, L., Xiong, L. . Quercetin and Quercitrin Attenuates the Inflammatory Response and Oxidative Stress in LPS-Induced RAW264.7 Cells: In Vitro Assessment and a Theoretical Model. *BioMed research international*, 2019, 7039802. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2019/7039802>
- [48] Kim, J., Kim, S. R., Choi, Y. H., Shin, J. Y., Kim, C. D., Kang, N. G., Park, B. C., Lee, S. Quercitrin Stimulates Hair Growth with Enhanced Expression of Growth Factors via Activation of MAPK/CREB Signaling Pathway. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2020, 25(17), 4004. <https://doi.org/10.3390/molecules25174004>
- [49] Córdoba, A., Manzanaro-Moreno, N., Colom, C., Rønold, H., Lyngstadaas, S., Monjo, M., Ramis, J. Quercitrin Nanocoated Implant Surfaces Reduce Osteoclast Activity In Vitro and In Vivo. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018, 19(11). ISSN 1422-0067. Dostupné z: [doi:10.3390/ijms19113319](https://doi.org/10.3390/ijms19113319)
- [50] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 1794427, Chlorogenic acid. [online]. [cit. 2021-03-27]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chlorogenic-acid>.

- [51] Jeszka-Skowron, M., Sentkowska, A., Pyrzyńska, K. et al. Chlorogenic acids, caffeine content and antioxidant properties of green coffee extracts: influence of green coffee bean preparation. *European Food Research and Technology*, 2016, 242, 1403–1409. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2643-y>
- [52] Gagliardini, E., Benigni, A., & Perico, N. Pharmacological Induction of Kidney Regeneration. *Kidney Transplantation, Bioengineering and Regeneration*, 2017, 1025–1037. Dostupné z doi:10.1016/b978-0-12-801734-0.00074-6
- [53] Mei, Y., Sun, H., Du, G., Wang, X., Lyu, D. Exogenous chlorogenic acid alleviates oxidative stress in apple leaves by enhancing antioxidant capacity, *Scientia Horticulturae*, Volume 274, 2020, 109676, ISSN 0304-4238. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109676>.
- [54] Naveed M, Hejazi V, Abbas M, Kamboh A. A., Khan G. J., Shumzaid M, Ahmad F, Babazadeh D, FangFang X, Modarresi-Ghazani F, WenHua L, XiaoHui Z. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomed Pharmacother.* 2018, Jan, 97:67-74. PMID: 29080460. Dostupné z: doi:10.1016/j.biopha.2017.10.064.
- [55] Právní předpisy vztahující se k doplňkům stravy a obecné informace o doplňcích stravy [online]. 2019 [cit. 2021-03-27]. Dostupné z: <https://www.szpi.gov.cz/clanek/pravni-predpisy-vztahujici-se-k-doplncikum-stravy-a-obecne-informace-o-doplncich-stravy.aspx?q=Y2hudW09Mg%3D%3D>
- [56] Tondl, L. Doplnky výživy ve sportu. Praha, 2016. Bakalářská práce. 3. lékařská fakulta, Univerzita Karlova v Praze.
- [57] ELANCYL Slim Design Zeštíhlující olej 150ml. <https://www.pilulka.cz/> [online]. [cit. 2021-03-27]. Dostupné z: <https://www.pilulka.cz/elancyl-slim-design-zestihlujici-olej-150ml>
- [58] ELANCYL Slim Design Zeštíhlující olej 150 ml. [SLéky.cz](https://www.sleky.cz/) [online]. [cit. 2021-03-27]. Dostupné z: <https://www.sleky.cz/elancyl-slim-design-zestihlujici-olej-150ml-1>
- [59] Life Extension Apple Wise Polyphenol Extract, 30 Vcaps. <https://www.fruugo.cz/?language=en> [online]. [cit. 2021-03-27]. Dostupné z: <https://www.fruugo.cz/life-extension-apple-wise-polyphenol-extract-30-vcaps/p->

51876070-

104505038?language=en&ac=croud&gclid=EAIaIQobChMI0rrhh8_E7gIVCOqyC
h1-nwhpEAQYASABEgKgPvD_BwE

- [60] Phloridzin Pure. YOUGU Biotech [online]. [cit. 2021-03-27]. Dostupné z: <http://m.cz.mushroom-extract.com/cosmetic-ingredients/natural-cosmetics-ingredients/phloridzin-pure.html>
- [61] Green Apple 10:1 Extract Capsules Apple polyphenols phloretin phloridzin. Ebay [online]. [cit. 2021-03-27]. Dostupné z: <https://www.ebay.com/itm/Green-Apple-10-1-Extract-Capsules-Apple-polyphenols-phloretin-phloridzin/112188550854?var=412364210903&hash=item1a1ef56ec6:g:HoMAAO SwDn5bPlzu>
- [62] Phloretin. Xi'an bingo biochem Technology Co., LTD [online]. [cit. 2021-03-27]. Dostupné z: <http://m.cz.xa-bingo.com/herbal-medicine-powder/herbal-extract/phloretin.html>
- [63] Shin, S. K., Cho, S. J., Jung, U. J., Ryu, R., Choi, M. S. Phlorizin Supplementation Attenuates Obesity, Inflammation, and Hyperglycemia in Diet-Induced Obese Mice Fed a High-Fat Diet. *Nutrients*, 2016, 8(2), 92. <https://doi.org/10.3390/nu8020092>
- [64] Vito Life Kyselina chlorogenová 100 tobolk. Pilulka.cz [online]. [cit. 2021-03-27]. Dostupné z: <https://www.pilulka.cz/vito-life-kyselina-chlorogenova-100-tobolek>
- [65] GreenFood Nutrition Rutin 60kapslí. Pilulka.cz [online]. [cit. 2021-03-27]. Dostupné z: <https://www.pilulka.cz/rutin>
- [66] Dvořáková, M., Dostálek, P., Hulín, P. Analytické metody stanovení polyfenolů ve sladínách, mladínách a pivech. Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha. *Kvasný průmysl*, roč. 52, 2006, číslo 4. Dostupné z: <https://www.kvasnyprumysl.cz/pdfs/kpr/2006/04/02.pdf>
- [67] Vybíralová, P. Stanovení fenolických látek v potravinách. Olomouc, 2016. Diplomová práce. Univerzita Palackého v Olomouci, fakulta přírodovědecká.

- [68] Nováková L., Douša M.: Moderní HPLC separace v teorii a praxi. 1.vydání, Europrint a.s., 2013, 32-87, ISBN 978-80-260-4243-3
- [69] Vysokoučinná kvapalinová chromatografie (HPLC). Biopedia [online]. [cit. 2021-03-27]. Dostupné z: <https://biopedia.sk/molekularna-biologia/hplc>
- [70] Schulzová, V. HPLC v analýze potravin a přírodních produktů, Přístroj, kolony. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. [cit. 2021-03-27]. Dostupné z: <https://web.vscht.cz/~schulzov/HPLC/3%202019%20HPLC%20pristroj%20kolony.pdf>
- [71] Column Care and Use Instructions. Manualzz, the universal manuals library [online]. [cit. 2021-03-27]. Dostupné z: <https://manualzz.com/doc/6928799/ymc-triart-c18-exrs-1.9-%C2%B5m>
- [72] YMC-Triart-VMC Catalogue 2017-2018 [online]. [cit. 2021-03-27]. Dostupné z: https://ymc.de/files/imported/publications/130/documents/VMC-Triart%20-%20VMC%20Catalogue%202017_2018.pdf
- [73] YMC-Triart C18 ExRS UHPLC. YMC America [online]. [cit. 2021-03-27]. Dostupné z: <https://www.ymc-america.com/ymc-triart-c18-exrs/>
- [74] Adamcová, Anežka. Stanovení floridzinu a jiných fenolických látek v listech jabloní pomocí HPLC. Hradec Králové, 2018. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.
- [75] Moravcová, Pavlína. Vývoj HPLC metody pro stanovení vybraných fenolických kyselin a flavonoidů v Tokajských vínech. Hradec Králové, 2019. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.
- [76] Sowa, A., Zgórková, G., Szykuła, A., Franciczek, R., Żbikowska, B., Gamian, A., Sroka, Z. "Analysis of Polyphenolic Compounds in Extracts from Leaves of Some Malus domestica Cultivars: Antiradical and Antimicrobial Analysis of These Extracts", BioMed Research International, vol. 2016, Article ID 6705431, 12 pages, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6705431>
- [77] Escarpa, A., González, M. C. Fast separation of (poly)phenolic compounds from apples and pears by high-performance liquid chromatography with diode-array

detection, *Journal of Chromatography A*, 1999, Volume 830, Issue 2, 301-309, ISSN 0021-9673, [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00893-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00893-0).

- [78] Ye, M., Yue, T., Yuan, Y. Evolution of polyphenols and organic acids during the fermentation of apple cider. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Volume 94, Issue 14, 2951-2957. 2014. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jsfa.6639>
- [79] Xu, K., Deng, R., Lü, H. T. Preparative Isolation and Purification of Phlorizin from Apple Tree Bark by High-Speed Counter-Current Chromatography. *Asian Journal of Chemistry*, 2011, Vol. 23, No. 9, 3807-3810. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/286055008_Preparative_Isolation_and_Purification_of_Phlorizin_from_Apple_Tree_Bark_by_High-Speed_Counter-Current_Chromatography
- [80] Bai, L., Guo, S., Liu, Q., Cui, X., Zhang, X., Zhang, L., Yang, X., Hou, M., Ho, Ch-T., Bai, N. Characterization of nine polyphenols in fruits of *Malus pumila* Mill by high-performance liquid chromatography, *Journal of Food and Drug Analysis*, 2016, Volume 24, Issue 2, 293-298, ISSN 1021-9498, <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2015.10.002>.
- [81] Kindt M, Orsini M. C., Costantini B. Improved high-performance liquid chromatography-diode array detection method for the determination of phenolic compounds in leaves and peels from different apple varieties. *Journal of Chromatographic Science*. 2007, 45(8), 507-14. PMID: 18019560. Dostupné z doi: 10.1093/chromsci/45.8.507.
- [82] Šírová, K. Analýza nutričně významných látek v odpadních produktech ovocných stromů pomocí HPLC. Hradec Králové, 2020. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická Fakulta v Hradci Králové.
- [83] Chocholouš, P., Gil, R., Acebal, C. C., Kubala, V., Šatínský, D., Solich, P. Multilayered particle-packed column: Evaluation and comparison with monolithic and core-shell particle columns for the determination of red azo dyes in Sequential Injection Chromatography. *Journal of Separation Science*, 2017, 40(6), 1225–1233. Dostupné z doi:10.1002/jssc.201601224

- [84] Patel, K., Patel, D. K. The Beneficial Role of Rutin, A Naturally Occurring Flavonoid in Health Promotion and Disease Prevention: A systematic Review and Update. Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases. Elsevier, 2019, 457-479. ISBN 9780128138205. Dostupné z doi: 10.1016/B978-0-12-813820-5.00026-X
- [85] Rana, S., Kumar, S., Rana, A., Sharma, V., Katoch, P., Padwad, Y., Bhusman, S. Phenolic constituents from apple tree leaves and their in vitro biological activity. Industrial Crops and Products, 2016, volume 90, 118-125. ISSN 0926-6690. Dostupné z doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.06.027>