

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Miroslava Dušková

**ANALYTICKÉ PŘÍSTUPY KE STANOVENÍ A IDENTIFIKACI
FLAVONOIDŮ**

Analytical approaches of identification and quantification of flavonoids

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: **prof. RNDr. Jiří Hudeček, CSc.**

Praha 2014

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 22. srpna 2014

.....
podpis

Poděkování

Ráda bych chtěla poděkovat panu Prof. RNDr. Jiřímu Hudečkovi, CSc. za odborné vedení, cenné rady a připomínky. Zároveň děkuji za trpělivost a čas, který mi při vypracování mé bakalářské práce věnoval.

Abstrakt

V úvodu práce jsou shrnuty a přiblíženy poznatky o flavonoidech - jejich dělení podle struktury, výskyt v lidské stravě, biosyntéza a příznivé účinky na lidské zdraví. Dále jsou uvedeny nejčastější analytické přístupy k jejich identifikaci a stanovení.

V experimentální části byla stanovována čistota dvou standardních látek flavonoidní povahy – myricetinu a dihydromyricetinu. K tomu byla využita spektroskopie v ultrafialové a viditelné oblasti. Zjištěné polohy absorpčních maxim obou látek odpovídají údajům z literatury. Následně byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reversní fázi k určení případnému obsahu nečistot. Z chromatogramů získaných po provedení optimalizace eluce je zřejmé, že čistota preparátů je dosti vysoká a je v souladu s dodanými certifikáty.

Klíčová slova

flavonoidy, stanovení antioxidantů, identifikace biologicky aktivních látek

Abstract

The first part of this thesis summarizes the available information about flavonoids and gives deeper insight into their classification, biosynthesis, occurrence in human diet and beneficial effects on human health. In the next part, the most widely used analytical approaches for identification and quantification of these compounds are described in detail.

The aim of experimental part of this thesis was to determine the purity of two samples of flavonoid compounds – myricetin and dihydromyricetin. As the first step, ultraviolet–visible spectroscopy was used. The determined wavelengths of absorbance maxima are in accordance with literary data for both compounds. Next, the reversed-phase high-performance liquid chromatography was used for determination of eventual impurities. The chromatographs obtained with optimized elution protocols are demonstrating showing the purity of both samples, corresponding to the manufacturers' certificates.

Key words

flavonoids, quantification of antioxidants, identification of biologically active compounds

Obsah

Seznam zkratk a symbolů	7
1 Cíl bakalářské práce	8
2 Přehled literatury	9
2.1 Flavonoidy a jejich dělení	9
2.1.1 Flavony	10
2.1.2 Flavan-3-oly (Flavanoly)	11
2.1.3 Flavanony	11
2.1.4 Flavonoly	12
2.1.5 Anthokyanidiny	13
2.1.6 Isoflavony	14
2.2 Biosyntéza flavonoidů	15
2.2.1 Šikimátová biosyntéza	15
2.2.2 Fenylypropanoidová biosyntéza	18
2.3 Pozitivní účinek flavonoidů na lidské zdraví	18
2.4 Dihydromyricetin	19
2.5 Myricetin	20
2.6 Analytické přístupy ke stanovení flavonoidů	21
2.6.1 Příprava vzorku	21
2.6.2 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)	22
2.6.3 Plynová chromatografie (GC)	22
2.6.4 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	23
2.6.5 Kapilární elektroforéza (CE)	23
2.6.6 UV–Vis spektroskopie	24
3 Experimentální část	25
3.1 Chemikálie	25
3.2 Přístroje	25
3.3 Metody	26
3.3.1 Stanovení absorpčních maxim dihydromyricetinu a myricetinu	26
3.3.2 Metoda RP-HPLC ke stanovení čistoty dihydromyricetinu a myricetinu	26
4 Výsledky a diskuse	28
4.1 Absorpční maxima dihydromyricetinu a myricetinu	28
4.2 Chromatogramy dihydromyricetinu a myricetinu s různým složením mobilní fáze	31
4.2.1 Chromatogramy dihydromyricetinu	32
4.2.2 Chromatogramy myricetinu	34
5 Závěr	39
6 Literatura	40

Seznam zkratek a symbolů

a.u.	absorbanční jednotka
CE	kapilární elektroforéza
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
L	jednotka litru (použita pro odlišení od čísla „1“)
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reversní fázi
Phe	fenylalanin
<i>spp.</i>	více druhů (z lat. <i>Species pluralis</i>)
t	čas
Trp	tryptofan
Tyr	tyrosin
UV	ultrafialová část spektra
Vis	viditelná část spektra

1 Cíl bakalářské práce

Cílem mé bakalářské bylo seznámení se s literaturou, která pojednává o rostlinných fenolických látkách – flavonoidech, jejich dělení, biosyntéze, účinku na lidské zdraví a jednotlivých analytických metodách k jejich stanovení.

V experimentální části bylo cílem ověřit čistotu dvou standardních látek – myricetinu a dihydromyricetinu. K tomu byly využity dvě analytické metody, UV–Vis spektroskopie a vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reversní fázi (RP-HPLC).

2 PŘEHLED LITERATURY

Flavonoidy jsou fenolické látky nacházející se v rostlinách jako sekundární metabolity, tedy jako organické sloučeniny, které se přímo nepodílejí na procesu růstu nebo vývoje rostliny. Při konzumaci ve formě ovoce či zeleniny působí příznivě na lidské zdraví. Flavonoidy jsou široce rozšířeny skrze celou rostlinnou říši; v přírodě se nacházejí v rostlinách, ovoci, obilninách, květinách a nápojích jako je čaj či víno. Jsou látkami, které dávají těmto produktům jejich charakteristickou barvu i chuť [1], [2].

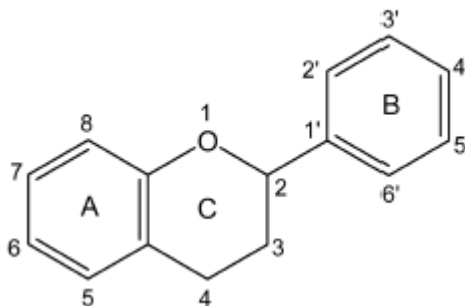
2.1 Flavonoidy a jejich dělení

Dnes je známo přibližně 6500 různých flavonoidů. Vedle chlorofylu a karotenoidů jsou nejčastějším rostlinným pigmentem [3], [4].

Základní strukturou flavonoidů je 2-fenyl-1,4-benzopyron - flavanový skelet (Obr. 1).

Ve flavonoidech běžně dochází k hydroxylaci v pozici 3, 5, 7, 3', 4' a/nebo 5'. Tyto hydroxylované skupiny jsou pak dále methylovány, acetylovány či sulfatovány.

V rostlinách se flavonoidy nacházejí jako *O*- nebo *C*- glykosidy; nejčastěji však jako *O*-glykosidy, které mají cukernou složku navázanou přes hydroxylovou skupinu aglykonu, obvykle v poloze 3 nebo 7. Naproti tomu mají *C*-glykosidy cukr vázaný přímo na uhlíku aglykonu, obvykle C6 nebo C8. Nejčastějšími sacharidy bývá rhamnosa, glukosa, galaktosa a arabinosa [5].



Obr. 1: Základní struktura flavonoidů [4]

Flavonoidy mohou být podle různých modifikací na C kruhu rozděleny do několika tříd: flavony, flavanoly, flavanony, flavonoly, anthokyanidiny a isoflavony [6].

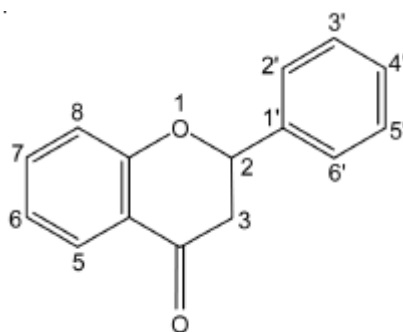
V následujících oddílech jsou tyto hlavní třídy popsány detailněji.

2.1.1 Flavony

Flavony, flavonoly a flavanony jsou skupiny, které si jsou strukturně velmi podobné. Flavony plní mnoho rozmanitých funkcí, ať už v květinách, kde jsou zodpovědné za jejich žluté zbarvení, nebo v citrusových plodech, kterým dodávají typickou kyselou chuť.

Největší zastoupení této skupiny ve stravě zaujímají apigenin a luteolin [7]. Tito zástupci flavonů jsou zobrazeny v Tabulce 1.

Tabulka 1: Struktura flavonu a jeho substituovaných derivátů [4]



Flavon

Pozice substituentu	5	7	3'	4'
Apigenin	OH	OH	-	OH
Luteolin	OH	OH	OH	OH
Chrysin	OH	OH	-	-

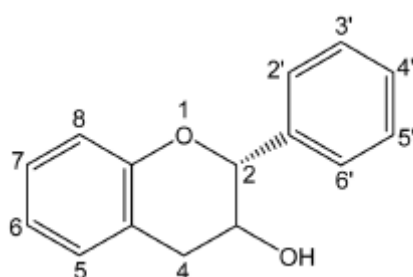
Výskyt v potravinách

Flavony nejsou natolik rozšířenou skupinou, co se jejich obsahu v potravě týče. Jejich významnější obsah byl zaznamenán pouze v celeru (*Apium graveolens*), petrželi (*Petroselinum crispum*) či artyčoku (*Clara scolymus*) [8].

2.1.2 Flavan-3-oly (Flavanoly)

Flavanoly představují nejrozšířenější skupinu flavonoidů, co se jejich konzumace v lidské stravě týče. Ovlivňují vlastnosti rostlin jako je trpkost, hořkost, kyselost, sladkost, aroma či barva [9]. Flavanoly jsou strukturně nejvíce komplexní skupinou flavonoidů, vyskytující se od jednoduchého monomerního (+)-katechinu a jeho izomeru (-)-epikatechinu, až po oligomerické a polymerické proanthokyanidiny, známé také jako kondenzované taniny [10].

Tabulka 2: Struktura flavanolu a jeho substituovaných derivátů [4]



Flavanol

Pozice substituentu	3	5	7	3'	4'	5'
(+)-Katechin	β OH	OH	OH	OH	OH	-
(-)-Epikatechin	α OH	OH	OH	OH	OH	-
(-)-Epigallokatechin	α OH	OH	OH	OH	OH	OH

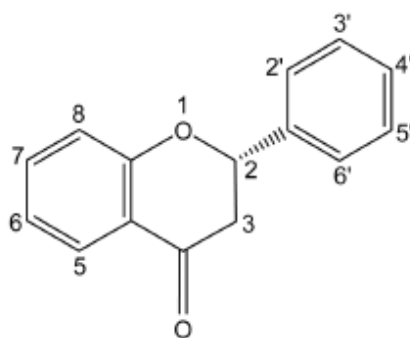
Výskyt v potravinách

Flavan-3-oly jsou hojně obsaženy v ovoci, jako jsou meruňky (*Prunus armeniaca*), višně (*Prunus cerasus*), hroznové víno a ostružiny (*Rubus spp.*) [11]. Dále byly detekovány v mátě (*Mentha rotundifolia*), bazalce (*Ocimum basilicum*), rozmarýnu (*Rosemarinus officinalis*), šalvěji (*Salvia officinalis*) a kopru (*Anethum graveolens*) [12].

2.1.3 Flavanony

Skupinu flavanonů nejčastěji zastupují naringenin, hesperetin nebo eriodyktol. Samotná struktura flavanonů je vysoce reaktivní a podléhá hydroxylaci, glykosylaci či O-methylaci. Flavanony se téměř výhradně vyskytují v citrusových plodech, a to ve své glykosidované formě.

Tabulka 3: Struktura flavanonu a jeho substituovaných derivátů [4]



Flavanon

Pozice substituentu	5	7	3'	4'
Naringenin	OH	OH	-	OH
Hesperetin	OH	OH	OH	OCH ₃

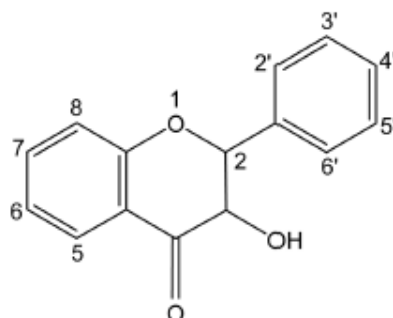
Výskyt v citrusech

Nejvyšší obsah flavanonů obsahuje citrusová kůra. Nejběžněji zastoupeným flavanonovým glykosidem je hesperetin-7-*O*-rutinosid (hesperidin), ve vysoké koncentraci obsažený jak v pomeranči (*Citrus sinensis*), mandarince (*Citrus clementina*) citronu (*Citrus limon*), limetě (*Citrus aurantifolia*), či grapefruitu (*Citrus paradisi*) [7], [11], [13].

2.1.4 Flavonoly

Flavonoly jsou nejrozšířenější skupinou flavonoidů v rostlinné stravě. Jejich barva přechází od bílé po žlutou a je závislá na struktuře konkrétního flavonolu. Hlavními zástupci jsou kvercetin, kaempferol či myricetin [11].

Tabulka 4: Struktura flavonolu a jeho substituovaných derivátů [4]



Flavonol

Pozice substituentu	5	7	3'	4'	5'
Kvercetin	OH	OH	OH	-	-
Kaempferol	OH	-	-	-	-
Galangin	OH	-	OH	OH	OH
Fisetin	OH	OH	OH	-	-
Myricetin	OH	OH	OH	OH	OH

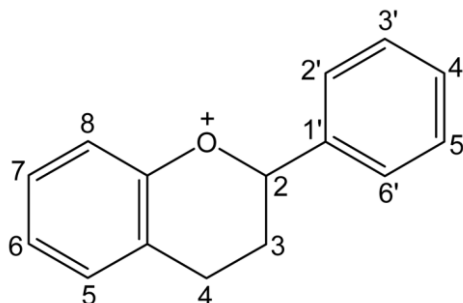
Výskyt v potravinách a léčivých rostlinách

Flavonoly se, podobně jako ostatní skupiny flavonoidů, nachází v různých druzích ovoce i zeleniny. Obzvláště vysoké množství těchto látek obsahuje cibule v čerstvém stavu. Je dokázáno, že jakákoliv tepelná úprava (vaření, smažení) snižuje obsah flavonolů v dané potravine [14]. V práci [15] bylo stanovováno množství flavonolů ve 22 materiálech rostlinného původu (9 druhů zeleniny, 5 druhů ovoce a 8 druhů léčivých rostlin). Nejvyšší koncentraci celkových flavonolů obsahovala rostlina moringa olejodárná (*Moringa oleifera*). Vysoký obsah dále vykazovaly i jahody (*Fragaria ananassa*), květák (*Brassica oleracea*), špenát (*Spinacia oleracea*), či plody fíkovníku (*Ficus religiosa*).

2.1.5 Anthokyanidiny

Anthokyanidiny jsou látky podílející se na červeném, modrém a fialovém zabarvení ovoce a květin. Jsou taktéž obsaženy v listech, stoncích i kořenech rostlin. Nejčastěji se vyskytují v podobě cukerných glykosidů - anthokyanů. Anthokyanidiny jsou často používány jako přírodní barviva [7], [10], [16].

Tabulka 5: Struktura anthokyanidinu a jeho substituovaných derivátů [4]



Anthokyanidin

Pozice substituentu	3	5	7	3'	4'	5'
Kyanidin	OH	OH	OH	OH	OH	-
Kyanin	O-Glu	OH	OH	OH	OH	-
Peonidin	OH	OH	OH	OCH ₃	OH	-
Delfinidin	-	OH	OH	OH	-	OH
Pelargonidin	OH	OH	OH	-	OH	-
Malvidin	OH	OH	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃

Glu = glukosid

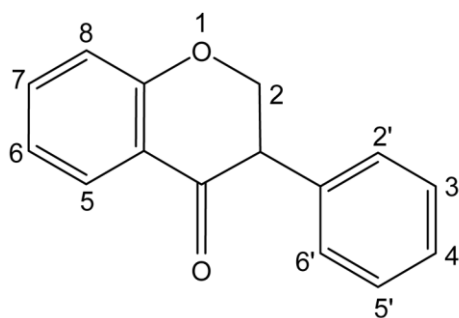
Výskyt v potravě

Anthokyany se nacházejí převážně v bobulovitých plodech, jako je brusinka (*Vaccinium macrocarpon*), ostružina (*Rubus spp.*) či bez (*Sambucus nigra*), kde se specificky nachází jen jeden zástupce anthokyanů. Na rozdíl od borůvky (*Vaccinium corymbosum*) či černého rybízu (*Ribes nigrum*), ve kterých můžeme najít široké spektrum těchto látek. Vysoké množství antokyanů je také obsaženo v červeném víně [8], [10].

2.1.6 Isoflavony

Isoflavony se od ostatních flavonoidů liší připojením B kruhu v pozici C3 místo C2. Vyskytují se výhradně v luštěninách.

Tabulka 6: Struktura isoflavonu a jeho substituovaných derivátů [4]



Isoflavon

Pozice substituentu	5	7	4'
Genistein	OH	OH	OH
Daidzein	-	OH	OH

Výskyt v luštěninách

Prakticky jediným zástupcem obsahující vyšší množství isoflavonů je sója luštinatá (*Glycine max*). Ta obsahuje daidzein a genistein, látky které se taktéž vyskytují v černých fazolích (*Phaseolus vulgaris*) či hrachu setém (*Pisum sativum*) [17].

2.2 Biosyntéza flavonoidů

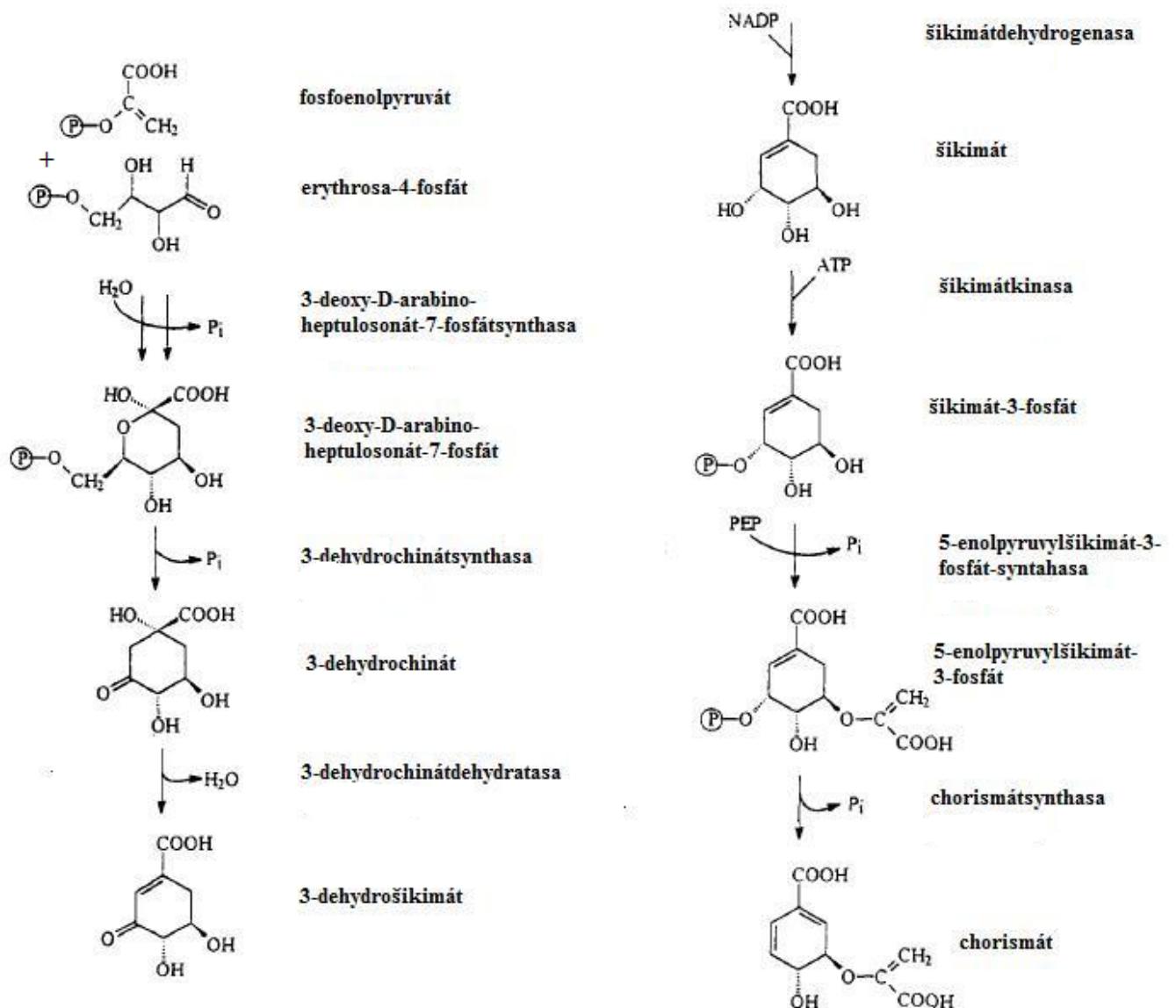
Flavonoidy se syntetizují v cytoplazmě rostlin dvěma cestami: šikimátovou, při které vzniká kruh B a fenylypropanoidovou, při které vzniká z acetátových jednotek kruh A.

2.2.1 Šikimátová biosyntéza

Šikimátová cesta je jednou z nejvýznamnějších biosyntetických přeměn probíhající ve vyšších rostlinách. Jejím výsledkem je totiž syntéza tří aromatických aminokyselin – tryptofanu, fenylalaninu a tyrosinu. Název této cesty vznikl z prvního identifikovaného meziprojektu, šikimátu, který byl poprvé izolován z ovocného stromu *Illicium anisatum*, běžně známého jako badyáník anýzový, japonsky *Shikimi* [18].

V prvním kroku této cesty spolu reaguje meziprojekt glykolýzy, fosfoenolpyruvát a meziprojekt pentosafosfátového cyklu, D-erytroza-4-fosfát. Tento krok je katalyzován 3-deoxy-D-arabino-heptulosonát-7-fosfátsynthasou (DAHP) za vzniku sedmiuhlíkaté sloučeniny 3-deoxy-D-arabino-heptulosonát-7-fosfátu. Dále se za působení 3-dehydrochinátsynthasy tvoří 3-dehydrochinát. V dalším kroku dochází k odštěpení vody pomocí 3-dehydrochinátdehydratasy za vzniku 3-dehydrošikimátu, který se následně přeměňuje na šikimát za katalýzy šikimátdehydrogenasy.

Následuje fosforylace šikimátu za spotřeby ATP a vzniku šikimát-3-fosfátu, ze kterého se následně za katalýzy 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát-synthasy a připojení další molekuly fosfoenolpyruvátu tvoří 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát. V posledním kroku dochází k tvorbě chorismátu, který je hlavním prekurzorem k tvorbě aromatických aminokyselin [19] (schéma biosyntézy chorismátu, Obr. 2 na str. 16).



Obr. 2: Schéma biosyntézy chorismátu podle [19], [20]

Tvorba fenylalaninu a tyrosinu

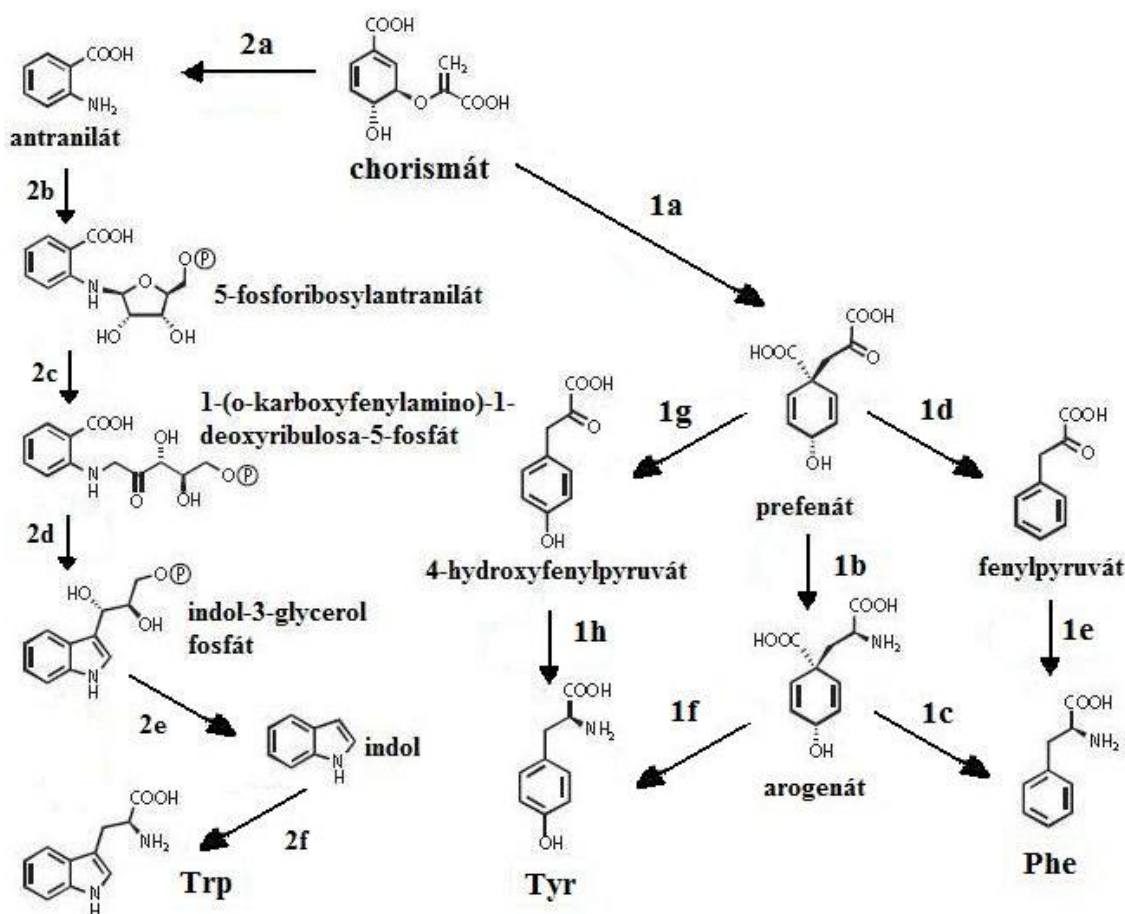
Při tvorbě fenylalaninu a alaninu hrají důležitou roli dvě látky – prefenát a arogenát. Prefenát vzniká z chorismátu pomocí chorismátmutasy (**1a**) a z něj následně pomocí prefenátaminotransferasy (**1b**) vzniká arogenát.

Z arogenátu následně vzniká fenylalanin buď přímo, za katalýzy arogenátdehydratasy (**1c**) nebo za vzniku meziproductu – fenylpyruvátu. Ten se tvoří za působení prefenátdehydratasy (**1d**) a následně se přeměňuje na fenylalanin za katalýzy fenylpyruvátaminotransferasy (**1e**).

Vznik tyrosinu probíhá obdobně: přímý vznik z arogenátu je katalyzován arogenátdehydrogenosou (**1f**), meziproduktem je 4-hydroxyfenylpyruvát, který vzniká působením prefenátdehydrogenasy (**1g**). Tyrosin pak následně vzniká za katalýzy 4-hydroxyfenylpyruvátaminotransferasy (**1h**).

Tvorba tryptofanu

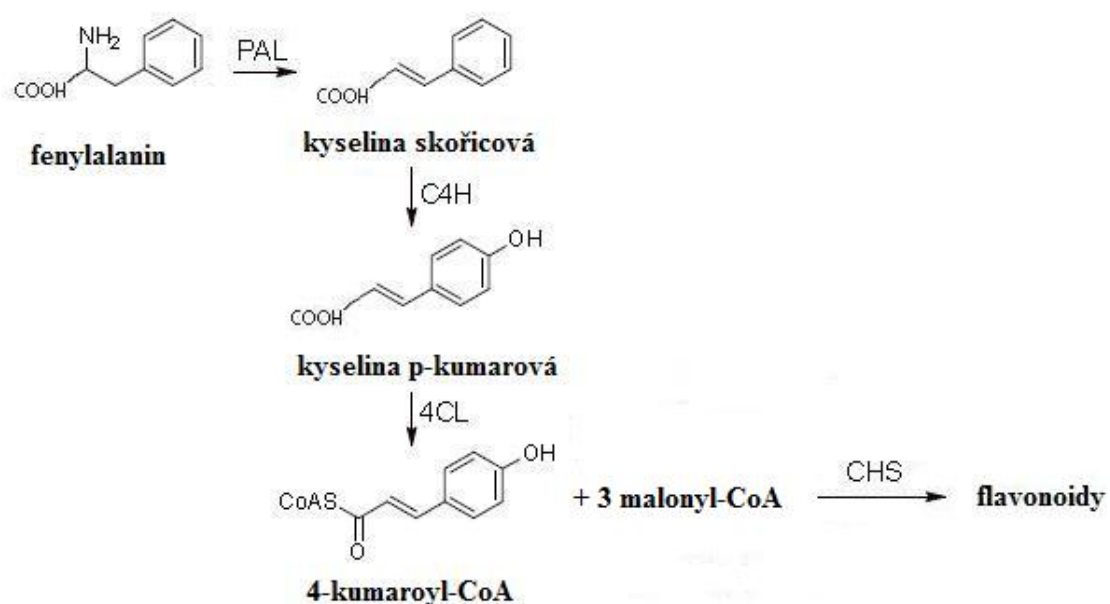
Biosyntéza tryptofanu opět vychází z chorismátu, který se pomocí antranilátsynthasy (**2a**) přeměňuje na antranilát. Na ten se pomocí enzymu fosforibosylantraniláttransferasy (**2b**) přenáší fosforibosylová skupina z fosforibosylpyrofosfátu a vzniká 5-fosforibosylantranilát. Fosforibosylantranilátisomerasa (**2c**) následně katalyzuje jeho přeměnu na 1-(o-karboxyfenylamino)-1-deoxyribulosa-5-fosfát. V dalším kroku indol-3-glycerolfosfátsynthasa (**2d**) katalyzuje vznik indol-3-glycerol fosfátu. Nakonec je za katalýzy α podjednotky tryptofansynthasy (**2e**) syntetizován indol a poté za působení β podjednotky tryptofansynthasy (**2f**) vzniká tryptofan [21], [22] (schéma biosyntézy Tyr, Phe a Trp na Obr. 3).



Obr. 3: Biosyntéza tyrosinu, fenylalaninu a tryptofanu podle [21], [22]. Názvy jednotlivých enzymů uvedeny v předchozím textu

2.2.2 Fenylypropanoidová biosyntéza

Po šikimátové cestě a biosyntéze aromatických aminokyselin následuje cesta fenylypropanoidová. V prvním kroku dochází k deaminaci tyrosinu enzymem fenylylalaninamoniolyasa (PAL) za vzniku kyseliny skořicové. Ta je následně přeměněna na kyselinu *p*-kumarovou cinamát-4-hydroxylasou (C4H). Dále 4-kumaroyl-CoA-ligasa (4CL) katalyzuje připojení koenzymu A a vznik 4-kumaroyl-CoA. Tento meziprodukt reaguje se třemi molekulami malonyl-CoA a za současné katalýzy chalkonsynthasy (CHS) se pak tvoří chalkon, který je hlavním prekurzorem k tvorbě flavonoidů (Obr. 4) [23], [24].



Obr. 4: Schéma fenylypropanoidové biosyntézy. Názvy jednotlivých enzymů uvedeny v předchozím textu podle [25]

2.3 Pozitivní účinek flavonoidů na lidské zdraví

Flavonoidy jsou předmětem studia hlavně díky svým příznivým účinkům na lidské zdraví. V roce 1936 byl pro látky flavonoidní povahy navržen pojem vitamin P díky pozitivnímu účinku na cévy [cit. dle 26]. Od tohoto označení však bylo brzy opuštěno, protože flavonoidy se přímo neshodovaly s definicí vitamínu [27].

Ve studiích *in vitro* i *in vivo* bylo vyhodnoceno mnoho biologických funkcí flavonoidů, jako je potlačení volných radikálů, modulace enzymové aktivity či inhibice buněčné proliferace. Taktéž mohou být potencionálně využity jako látky antibiotické, proti alergiím, průjmům, zánětům či vředovým onemocněním [28]. Dále flavonoidy inhibují peroxidaci lipidů [29], zlepšují permeabilitu cév a zesilují tloušťku cévní stěny [30] a celkově tak jejich vlastnosti přispívají ke snížení rizika výskytu rakoviny a infarktu [31].

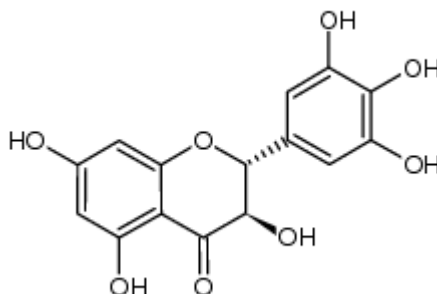
Za tyto ochranné funkce je zodpovědná antioxidační aktivita mnoha flavonoidních sloučenin. Flavonoidy ve spojení s dalšími antioxidanty, jako je například vitamin C nebo E, zabraňují lipidové peroxidaci v fosfolipidové dvojvrstvě, která je způsobena reaktivními formami kyslíku, které mohou v organismu způsobit poškození DNA, bílkovin či lipidů. Flavonoidy zachycují radikály vyvolávající řetězovou reakci a zároveň předcházejí dalšímu vývoji této reakce [32]. Antioxidační aktivita fenolických látek je také dána jejich konkrétní strukturou. Hydroxylová skupina na uhlících C4, C3' a C4' výrazně zvyšuje antioxidační potenciál dané sloučeniny [33]. Práce [34] taktéž dokazuje, že aglykony, jakou jsou kvercetin, luteolin, myricetin a kaempferol, mají vyšší antioxidační aktivitu než jejich konjugované formy, jako kvercetin-3-glukosid, kvercitrin a rutin.

Nejvyšší zastoupení ze všech flavonoidů v lidské stravě zaujímá kvercetin, který je přijímán hlavně v podobě čaje, cibule a jablka [35]. Dalším důležitým příjmem této látky je červené víno, jež je zodpovědné i za tzv. francouzský paradox. Jedná se o jev, vyskytující se u populace v oblasti Středomoří, u které je popisován nižší výskyt akutních srdečních příhod, při současné konzumaci nenasycených mastných kyselin a pití červeného vína. Právě flavonoidy v něm obsažené jsou alespoň částečně zodpovědné za tento paradox [36].

2.4 Dihydromyricetin

Dihydromyricetin neboli ampelopsin (sumární vzorec: $C_{15}H_{10}O_8$, strukturní vzorec na Obr. 5, str. 20) je flavanonol, vyskytující se v rostlinách pocházejících z jihovýchodní Asie, např. v *Ampelopsis grossedentata* [37] či *Hovenia dulcis*. Výtažky z těchto rostlin jsou hojně užívány v čínské medicíně, např. pro svou schopnost pozitivně ovlivňovat funkci jaterní buňky při různých jaterních chorobách (tzv. hepatoprotektivum). V práci [38] byly extrakty z rostlin rodu *Hovenia* podávány krysám a zkoumány účinky dihydromyricetinu při současné konzumaci ethanolu. Bylo dokázáno, že dihydromyricetin

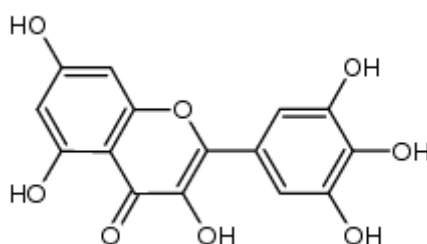
snižuje příznaky akutní intoxikace ethanolem, zlepšuje projevy abstinenčních příznaků u jedinců závislých na alkoholu, či pozitivně přispívá při léčbě této závislosti. Díky těmto i dalším vlastnostem je dihydromyricetin doporučován jako „lék“ na kocovinu.



Obr. 5: Strukturální vzorec dihydromyricetinu ($M_r = 320,25$ g/mol) [42]

2.5 Myricetin

Myricetin (sumární vzorec: $C_{15}H_{12}O_8$, strukturální vzorec viz Obr. 6) je flavonolem, nacházejícím se v různých druzích ovoce (např. v jahodách či švestkách), zelenině (špenátu či kvěťáku) [15], černém čaji, ale i v červeném víně [39]. Myricetin, stejně jako většina flavonolů, příznivě působí proti rakovinnému bujení. V práci [40] byla dokázána spojitost mezi zvýšenou konzumací myricetinu a následným snížením rizika výskytu rakoviny prostaty u mužů. V práci [41] byly zase dokázány preventivní účinky myricetinu (společně s kaempferolem a kvercetinem) proti výskytu rakoviny slinivky břišní u kuřáků.



Obr. 6: Strukturální vzorec myricetinu ($M_r = 318,24$ g/mol) [42]

2.6 Analytické přístupy ke stanovení flavonoidů

Analytické metody jsou rozšířeným, spolehlivým a stále se rozvíjejícím přístupem ke kvantitativní i kvalitativní analýze fenolických látek. Z tradičních metod se používají hlavně chromatografické (TLC, GC, HPLC), elektromigrační (CZE) a spektrometrické (UV-Vis). Jednotlivé techniky jsou detailněji popsány v následujících oddílech.

2.6.1 Příprava vzorku

Před vlastní analýzou je velmi důležitá úprava vzorku. Tou může být například jen jednoduchá filtrace či náročnější postup složený z několika kroků jako je hydrolýza či extrakce. Díky širokému spektru struktur, lišících se polaritou, kyselostí, počtem hydroxylových skupin či aromaticitou, neexistuje pevně daný a všeobecně platný postup pro úpravu vzorku.

Ve většině případů bývá prvním krokem úprav v případě pevných vzorků mletí, drcení či homogenizace; u tekutých zase filtrování či centrifugace [4].

Extrakce

V dalším kroku je nutná izolace bioaktivní látky ze vzorku pomocí extrakce. Flavonoidy bývají nejčastěji extrahovány methanolem, ethanolem, acetonem či směsí zmíněných a vody. K odstranění nepolárních částí z rostlinného materiálu jako vosku, olejů či chlorofylu, lze použít méně polární rozpouštědla, např. hexan, benzen, dichlormethan nebo chloroform.

Extrakce tuhou fází (SPE) je jednou z nejjednodušších a nejefektivnějších metod k izolaci fenolických látek. Nejčastěji je jako sorbent použit silikagel C₁₈ a roztok vzorku i rozpouštědlo je obvykle lehce okyseleno, aby nedošlo k ionizaci fenolických analytů.

Z modernějších, ale méně užívanějších extrakčních metod lze zmínit například extrakci mikrovlnným zářením (MAE), jejíž výhoda oproti ostatním extrakčním postupům spočívá ve výrazně nižší spotřebě použitého rozpouštědla, zvýšeném výtěžku extrakce a celkově se jedná o časově méně náročnou extrakci. Superkritická fluidní extrakce (SFE) využívá místo potenciálně nebezpečných rozpouštědel oxid uhličitý; nicméně právě ten je látkou nepolární a tato extrakce tak není vhodná pro polární flavonoidy.

Hydrolyza flavonoidů

Kyselá hydrolyza slouží primárně k odstranění cukerné složky z glykosidu. Postup hydrolyzy je nutný z anthokyanů na anthokyanidiny, neboť standardy antokyanů jsou velmi vzácné. Je prováděna tak, že vzorek obsahující flavonoidy je rozpuštěn ve směsi 2 M HCl:methanol (1:1 v/v) nebo v trifluoroctové kyselině (TFA):methanol.

Zásaditou hydrolyzu lze použít pouze při podezření na acylovou skupinu.

2.6.2 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

Tenkovrstvá chromatografie je vhodná pro rychlou analýzu materiálu obsahující flavonoidy. Retenční faktor a detekce skvrn pod UV zářením umožňuje přibližné určení struktury flavonoidů. Není však metodou typicky užívanou k jejich kvantifikaci.

Jako stacionární fáze je používána celulóza či silikagel nanesená na hliníkových deskách. Ty jsou obvykle 7 cm vysoké a 5 cm široké; vzorek je nanášen v podobě 1-2 mm skvrn, které jsou po vyvinutí vysušeny a detekovány pod UV světlem. Mobilní fází je 15% kyselina octová nebo 2,4,6-tribromanisol (TBA). Vizualizace flavonoidů je dosaženo po postřiku desky 1% metanolovým roztokem difenylboryloxyethylaminu a následnou detekcí pod UV světlem (366 nm). Většina flavonoidů má pak typickou barvu: 3',4'-dihydroxyflavony či flavonoly oranžovou; 4'-hydroxyflavony jsou žlutozelené [4], [44].

2.6.3 Plynová chromatografie (GC)

Výhoda plynové chromatografie spočívá, zejména v kombinaci se hmotnostní spektrometrií, v její vysoké citlivosti. Příprava vzorku pro GC zahrnuje již dříve zmíněnou hydrolyzu či velmi důležitou přeměnu analytu na těkavý derivát pomocí methylace. Ta se provádí nejčastěji připojením trimethylsilylové (TMS) skupiny či pomocí derivatizačních činidel. Těmi jsou *N*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-*N*-methyltrifluoroacetamid (TBDMS) a *N,O*-bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamid (BSTFA). Obvykle jsou flavonoidy po hydrolyze a derivatizaci nadávkovány na nepolární kolonu (nejčastěji kapilární, dlouhou 30 m, s velikostí částic stacionární silikonové fáze 0,25 μm) a separovány v 30–90 minutovém programu při teplotě kolem 300 °C.

Jako detektor v GC je pro stanovení fenolických látek užíván plamenový ionizační detektor (FID), který je však v poslední době častěji nahrazován hmotnostním spektrometrem, jež dosahuje výrazně vyšší citlivosti.

2.6.4 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Během posledních dvaceti let se HPLC stala hlavní analytickou technikou k separaci i kvantifikaci fenolických látek. Nejčastěji jsou flavonoidy separovány pomocí HPLC využívající kolonu na reversní fázi (RP-C18), gradientovou eluci, která na začátku obsahuje převážně vodnou fázi s postupným nárůstem organické fáze. Detekce probíhá pomocí UV/Vis detektoru.

Při většině HPLC analýz flavonoidů kolona nebývá termostatována, ale mírně zvýšená teplota mezi 30 a 40 °C je taktéž doporučována.

Acetonitril, methanol a jejich vodné roztoky jsou nejvíce používanými mobilními fázemi. V některých případech použití acetonitrilu vede k lepším výsledkům v kratším čase a obecně poskytuje ostřejší píky. Nicméně je methanol vzhledem ke své netoxické povaze preferovanější organickou fází v mobilní fázi. Pozornost by měla být také věnována pH během separace. Díky možné ionizaci flavonoidů by se pH v průběhu celé analýzy mělo pohybovat přibližně mezi 2–4, čehož je docíleno přidávkem malého množství kyseliny, například octové, mravenčí či fosforečné, k mobilní fázi. Gradientový eluční systém je při identifikaci fenolických látek užíván častěji než systém isokratický.

Flavonoidy jsou běžně detekovány pomocí UV–Vis, fotodiodového či fluorescenčního detektoru. Více o UV–Vis detekci viz oddíl 2.4.6.

2.6.5 Kapilární elektroforéza (CE)

Z elektromigračních separačních metod je pro stanovení flavonoidů primárně využívána kapilární zónová elektroforéza (CZE) a micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC). Separačním pufrům je typicky fosfátový nebo boritanový pufr; kapilára má vnitřní průměr od 50 do 100 μm ; objem dávkovaného vzorku je od 10 do 50 nL a pracovní napětí se pohybuje mezi 10 a 30 kV.

Detektorem je v CE nejčastěji UV absorpční fotometrický detektor díky jeho jednoduchému a dobře dostupnému použití. Úspěšně byl aplikován i elektrochemický (ED), fluorescenční, amperometrický (AD) i MS detektor.

V práci [46] byly analyzovány fenolické látky čaje, konkrétně theaflaviny a katechiny (deriváty flavan-3-olů), metodou CE a HPLC s UV detekcí v obou případech. Porovnání metod bylo následující: analýza CE byla časově méně náročnou (10 min versus 27 min); citlivost CE však byla pětikrát nižší v porovnání s HPLC.

2.6.6 UV–Vis spektroskopie

Spektrofotometrie je relativně jednoduchou a rychlou metodou k identifikaci i kvantifikaci flavonoidů. Výhoda spočívá v tom, že všechny flavonoidy poskytují typické absorpční spektrum. Každý aglykon obsahuje alespoň jeden aromatický kruh, který absorbuje ultrafialovou část spektra.

Za první absorpční maximum pohybující se mezi 240–285 nm je zodpovědný A-kruh; za druhé maximum, v oblasti mezi 300–550 nm, můžou substituenty a konjugáty na C-kruhu.

Folin-Denisovo a Folin-Ciocalteuho stanovení byla z prvních velmi rychle rozšířených metod k určení celkového obsahu fenolických látek v rostlinném materiálu. Tato stanovení jsou založena na redukci fosfomolybdenové a fosfowolframové kyseliny na modře zbarvené komplexy. Vzniklé komplexy silně absorbují při 760 nm. Obě tyto metody však jsou jen málo velmi specifické a nedetekují všechny fenolické skupiny v daném extraktu. Ke snížení specifity přispívá interference redukujících látek, jako je kyselina askorbová, aromatické aminy či cukry.

Další metodou je tzv. vanilinová metoda, specifická pro flavan-3-oly, dihydrochalkony a proanthokyanidiny, které mají volnou *meta*-hydroxy skupinu na kruhu B.

Často užívaná spektrofotometrická metoda ke stanovení celkových flavonoidů využívá žlutého zbarvení komplexu, který absorbuje při 425 nm. Toto stanovení je založeno na tvorbě komplexu hlinitého iontu Al^{3+} s karbonylovou a hydroxylovou skupinou flavonoidů [4], [5], [43] - [45].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie

Myricetin (Tokyo Chemical Industry, Japonsko), vzorek, jehož čistota byla zjišťována pomocí RP-HPLC analýzy.

Dihydromyricetin (Hangzhou APIChem Technology, Čína), vzorek, jehož čistota byla zjišťována pomocí RP-HPLC analýzy.

Methanol (Super Gradient, 99,99%, Labscan, Polsko), použit jako rozpouštědlo pro přípravu zásobních roztoků myricetinu a dihydromyricetinu; dále jako blank při UV–Vis spektroskopii a jako mobilní fáze při RP-HPLC analýze.

Kyselina orthofosforečná (p.a., 85%, Lachema, Česká republika), součást mobilní fáze při HPLC analýze.

Ultračistá voda (připravena přečištěním vody na Milipore Simplicity 185), součást mobilní fáze při HPLC analýze.

3.2 Přístroje

Spektrofotometr HP 8453 (Agilent Technologies, USA), použit k měření UV–Vis spekter myricetinu a dihydromyricetinu.

Kapalinový chromatograf LCP 3001 (Laboratorní přístroje Praha, Česká republika) s **UV detektorem LCD 2040** (Laboratorní přístroje Praha, Česká republika) a **zapisovačem LPP Recorder TZ 5000** (Laboratorní přístroje Praha, Česká republika). **Kolona C18** (Laboratorní přístroje Praha, Česká republika) o délce 10 cm, naplněná sorbentem o velikosti zrn 5 μm . Použit k určení čistoty myricetinu a dihydromyricetinu.

Analytické váhy Discovery (Schoeller, Česká republika), použity k navážení standardů myricetinu a dihydromyricetinu.

3.3 Metody

Ke stanovení čistoty standardních látek myricetinu a dihydromyricetinu byly použity dvě analytické metody: spektroskopie a vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi. K realizaci těchto metod bylo v obou případech využito zásobníků roztoku myricetinu a dihydromyricetinu o koncentraci 1 g/L, které byly připraveny následovně. Na analytických vahách bylo odváženo přibližně 5 mg standardu a tato navážka byla následně převedena do lékovky a rozpuštěna v 5 mL methanolu.

3.3.1 Stanovení absorpčních maxim dihydromyricetinu a myricetinu

K určení absorpčního maxima bylo využito jednopaprskového spektrofotometru s diodovým polem HP Agilent 8453 a počítačového programu Instrument 1 Online. Bylo měřeno v rozsahu vlnových délek 200–900 nm s krokem 1 nm a integračním časem 1 s. Měření bylo prováděno v 1 cm křemenných kyvetách. Jako blank byl použit methanol, který byl současně použit jako rozpouštědlo pro přípravu zásobních roztoků vzorku. Výsledná hodnota absorpčního maxima byla v další práci nastavena jako detekční vlnová délka při RP-HPLC. Dále byla kromě klasických absorpčních spekter vyzkoušena metoda derivačních spekter. Tato spektra byla spočtena pomocí počítačového programu Microcal Origin, kde bylo k vytvoření první derivace absorbance využito funkce Differentiate.

3.3.2 Metoda RP-HPLC ke stanovení čistoty dihydromyricetinu a myricetinu

K určení čistoty standardních látek myricetinu a dihydromyricetinu byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reversní fázi (RP-HPLC) s isokratickou elucí. Složení mobilní fáze bylo postupně optimalizováno s využitím dvou dílčích mobilních fází. Mobilní fáze A obsahovala 100% methanolu a mobilní fáze B ultračistou vodu s malým přídatkem (0,5% v:v) konc. kyseliny fosforečné (85%).

V počátečním experimentu obsahovala mobilní fáze pouze 100% složku A, dále byla použita mobilní fáze s poměrem A:B 75:25 (v:v) a nakonec A:B v poměru 60:40 (v:v). Průtok mobilní fáze byl během optimalizace měněn v rozsahu hodnot 0,3–0,8 mL/min; pro získání informací o minoritních příměsích byly postupně použity různé koncentrace vzorku (od neředěného zásobního roztoku přes desetinasobně zředěný až po stonásobně zředěný –

k ředění vzorku byla použita vždy příslušná směsná mobilní fáze) v kombinaci s nastavením citlivosti detektoru (hodnoty 4 až 32 a.u. na 1 V). Teplota kolony se pohybovala v rozmezí teplot laboratoře, tedy mezi 20–25 °C. Tlak systému se měnil v závislosti na nastavené rychlosti průtoku a složení mobilní fáze, v průběhu jedné eluce byl konstantní s přesností lepší než 10%. Objem vzorku dávkovaného na kolonu byl během všech měření konstantní, a to 20 µL. Další parametry, které se během analýzy neměnily, bylo nastavení zapisovače: rychlost posunu papíru (1 cm/min) a napětí (10 mV).

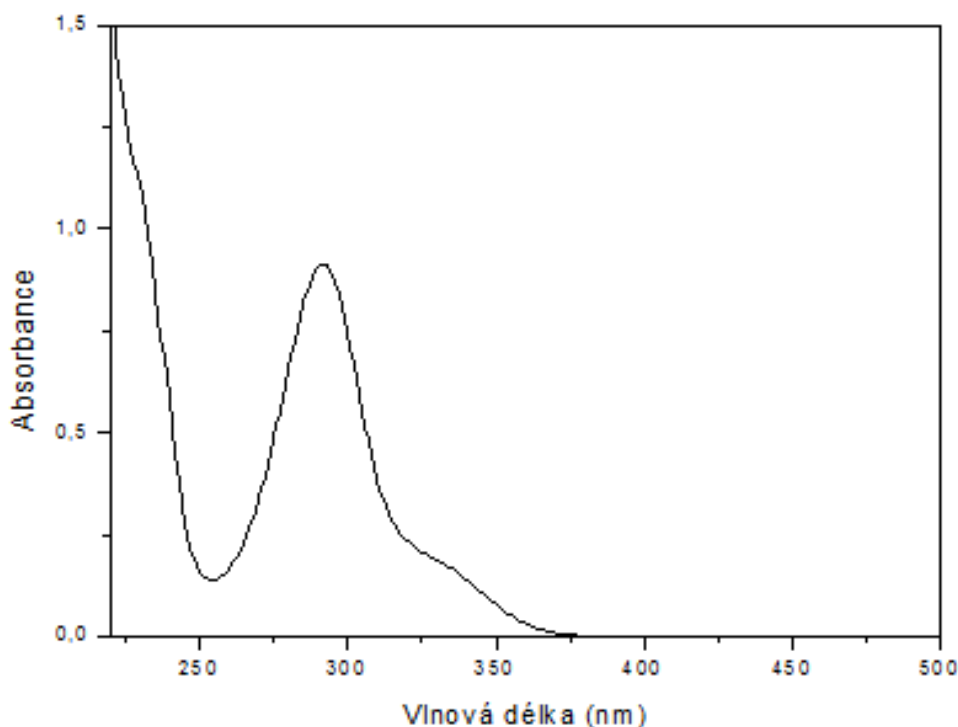
Byl použit UV-Vis detektor a konkrétní vlnová délka byla nastavena podle absorpčního maxima standardu zjištěného v předchozím experimentu; pro dihydromyricetin to bylo 290 nm a pro myricetin 290 nm a 370 nm. Chromatogramy získané přímo ze zapisovače byly pomocí pauzovacího papíru překresleny, skenovány, digitalizovány pomocí počítačového programu WinDig a nakonec byla takto získaná data zpracována programem Microcal Origin.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

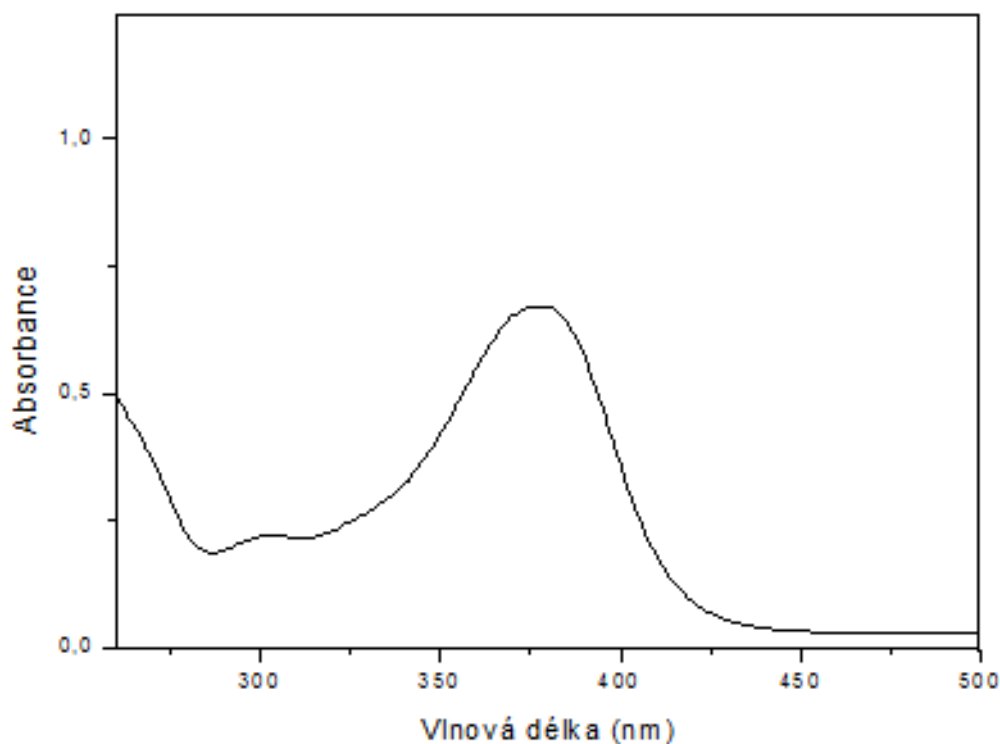
4.1 Absorpční maxima dihydromyricetinu a myricetinu

K určení absorpčních maxim myricetinu a dihydromyricetinu byl nejprve využit přímo zásobní roztok (koncentrace 1 g/L). V obou případech absorbance při této koncentraci dosahovala vyšší hodnoty než 4. Nejprve byl zásobní roztok proto naředěn desetkrát ($c = 100 \text{ mg/L}$); při této koncentraci však absorpční maximum stále přesahovalo 1 a.u. Optimální hodnoty absorbance pro měření by se podle [44] měly pohybovat v rozmezí absorbancí 0,05–1 a.u.. Těchto hodnot bylo pro oba vzorky dosaženo až při stonásobném zředění zásobního roztoku (výsledná koncentrace $c = 10 \text{ mg/L}$).

Získaná UV–Vis spektra stokrát naředěných vzorků jsou uvedena na Obr. 7 dole a na Obr. 8 (na str. 29).



Obr. 7: UV-Vis absorpční spektrum dihydromyricetinu o koncentraci 10 mg/L ($= 3,25 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$).

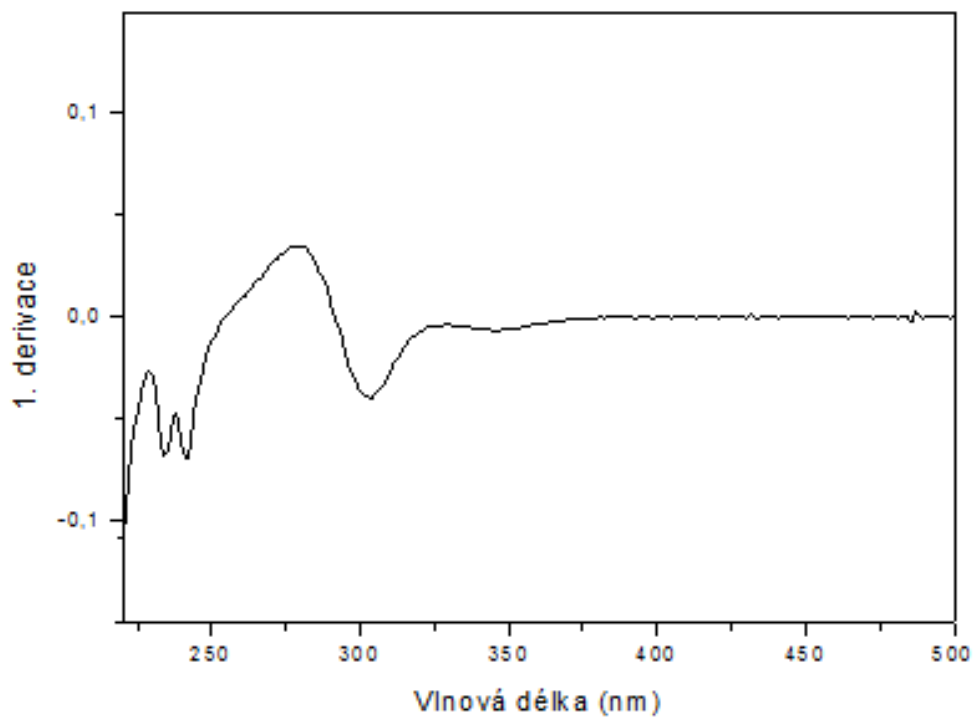


Obr. 8: UV-Vis absorpční spektrum myricetinu o koncentraci 10 mg/L ($= 3,15 \cdot 10^{-5}$ mol/L).

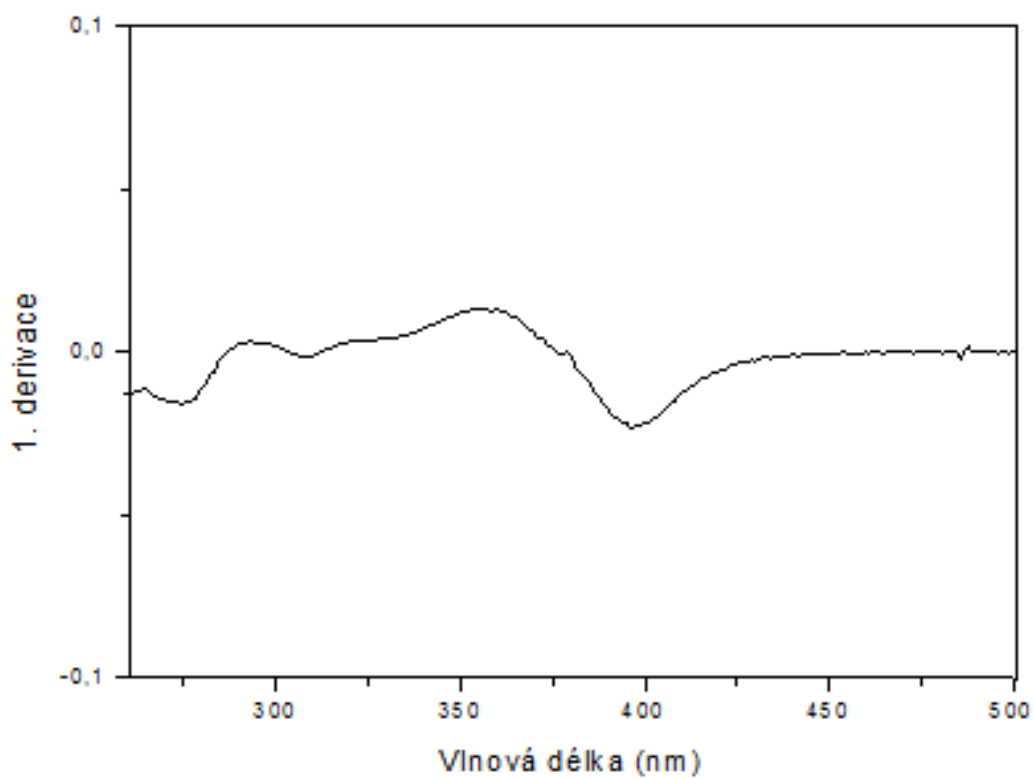
Absorpční maximum myricetinu je velmi široké, což ztěžuje přesné určení jeho polohy. Ta byla přístrojem vyhodnocena při 376 nm. Pro dihydromyricetin byla nalezena při 292 nm. Podle dostupné literatury bylo absorpční maximum pro dihydromyricetin stanoveno při 291 nm [47] a pro myricetin při 374 nm [48]. Tyto hodnoty jsou v rámci přesnosti měření v dobrém souladu s naměřenými daty.

Dále byla aplikována metoda derivačních spekter. Derivační spektrofotometrie je používanou metodou pro zvýraznění detailů průběhu záznamu, ke zvýraznění překrývajících se pásů v absorpčních spektrech, k přesnému odečtu vlnové délky maxima absorpčního pásu či pro kvantitativní a kvalitativní analýzu multikomponentních směsí. První derivace absorbance je přímo úměrná molární koncentraci látky [49].

Derivační spektra taktéž stokrát naředěných vzorků dihydromyricetinu i myricetinu jsou uvedena na následujících dvou obrázcích (Obr. 9 a Obr. 10 na str. 30).



Obr. 9: Derivační spektrum dihydromyricetinu o koncentraci 10 mg/L ($= 3,25 \cdot 10^{-5}$ mol/L).



Obr. 10: Derivační spektrum myricetinu o koncentraci 10 mg/L ($= 3,15 \cdot 10^{-5}$ mol/L).

Již z výsledných spekter dihydromyricetinu a myricetinu (viz Obr. 7 a 8 na str. 28 a 29) jsou patrné další absorpční přechody mimo hlavní absorpční maximum. U dihydromyricetinu je to zejména u hodnot pod 250 nm, kde se objevuje „raménko“ nízkoležícího absorpčního maxima; a dále můžeme pozorovat pobočné maximum mezi 325 a 350 nm (také se projevující jako „raménko“ hlavního absorpčního pásu).

Taktéž spektra myricetinu vykazují kromě hlavního absorpčního pásu ještě další nevýrazné absorpční maximum při cca 300 nm. Tato struktura je pro obě sloučeniny ještě výrazněji patrná ve spektrech první derivace (Obr. 9, 10; viz. str. 30). Nižší hodnoty první derivace pro myricetin odpovídají pozorovanému "hladšímu" průběhu absorpčního spektra.

Protože nejsou k dispozici „standardní“ spektra zkoumaných sloučenin, není možno rozhodnout, zda tyto minoritní pásy představují nevýrazné absorpční přechody, nebo zda odpovídají přítomnosti nějakých nečistot. Zejména u spektra, naměřeného pro myricetin, se přitom vzhledem k poloze pásu při cca 300 nm nabízí možnost určité kontaminace dihydromyricetinu (s absorpčním maximem při 290 nm), čemuž by odpovídal i průběh derivačního spektra.

Na základě těchto výsledků byla dále zvolena vlnová délka detekce pro RP-HPLC pro případné potvrzení a zjištění přibližného množství těchto kontaminací v daných standardních látkách.

4.2 Chromatogramy dihydromyricetinu a myricetinu s různým složením mobilní fáze

Metoda RP-HPLC byla použita k určení čistoty dihydromyricetinu a myricetinu. Chromatogramy dihydromyricetinu a myricetinu byly měřeny při 290 nm a 370 nm, přičemž při 290 nm absorbovaly obě látky; bylo tedy při analýze myricetinu využito detekce i při této vlnové délce.

K měření byly použity jak neředěné zásobní roztoky standardů o koncentraci 1 g/L; tak desetkrát ($c = 100$ mg/L) a stokrát ($c = 10$ mg/L) naředěné vzorky myricetinu a dihydromyricetinu (viz popisy obrázků chromatogramů).

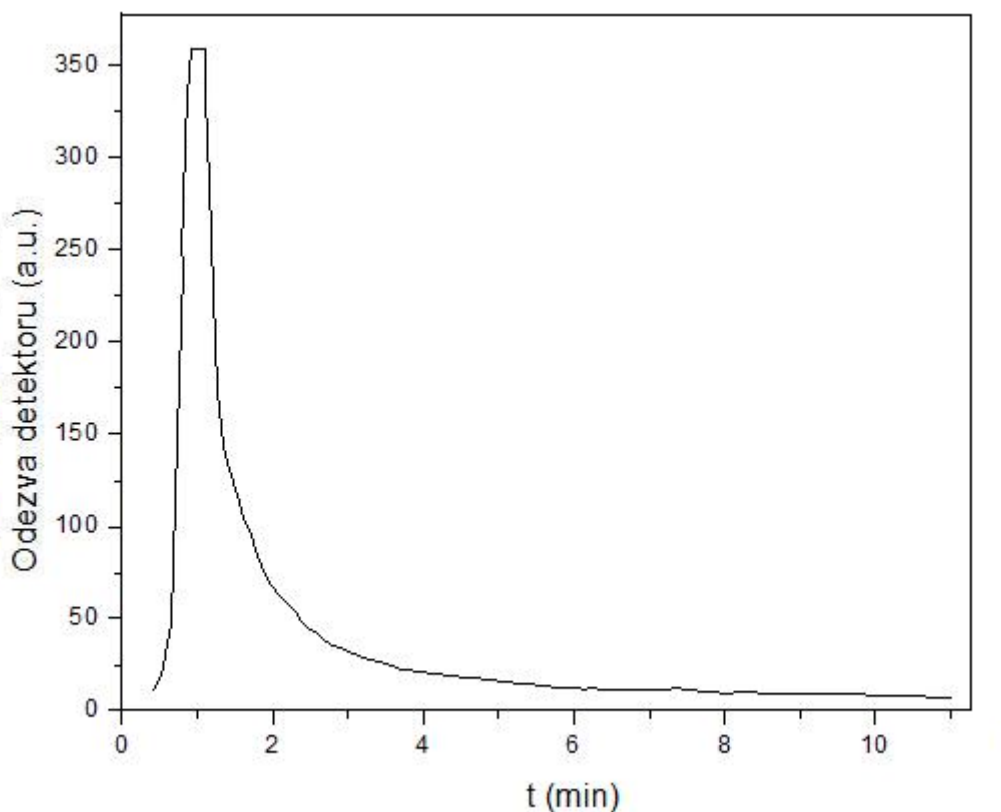
Nejprve byla použita pouze jednosložková mobilní fáze (100% methanol). Za těchto

podmínek lze pozorovat u obou vzorků pouze jeden chromatografický vrchol, s velmi nízkým retenčním časem (příp. objemem).

S ohledem na informace dostupné v literatuře [50], [51] byla dále vyzkoušena směsná mobilní fáze ve složení A:B (75:25) (v:v). Při těchto experimentálních podmínkách dochází k náznačce dělení, a proto byl pokus opakován se zvýšeným obsahem složky B a sníženou průtokovou rychlostí, aby bylo zajištěno lepšího rozdělení.

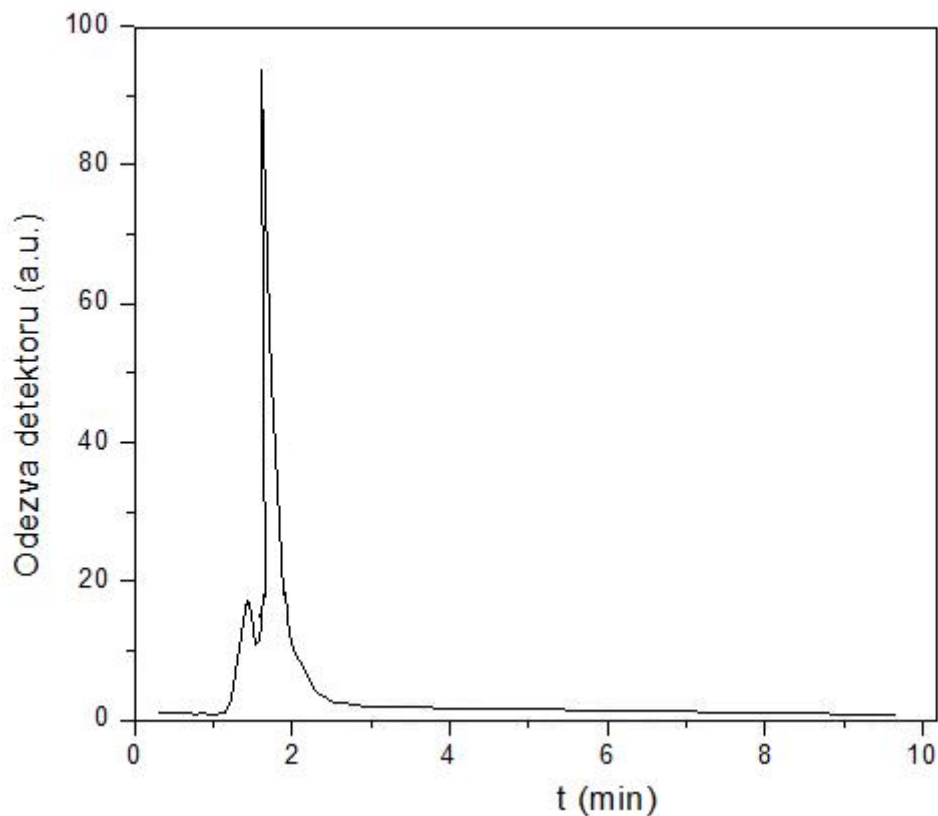
4.2.1 Chromatogramy dihydromyricetinu

Chromatogram na Obr. 11 dokazuje špatnou schopnost separace při jednosložkovém složení mobilní fáze, kdy pík putuje společně s čelem mobilní fáze.



Obr. 11: Chromatogram dihydromyricetinu, neředěného; citlivost detektoru: 4; složení mobilní fáze: 100% A; průtok mobilní fáze: 0,7 mL/min; detekce při vlnové délce 290 nm; tlak systému: 15 MPa.

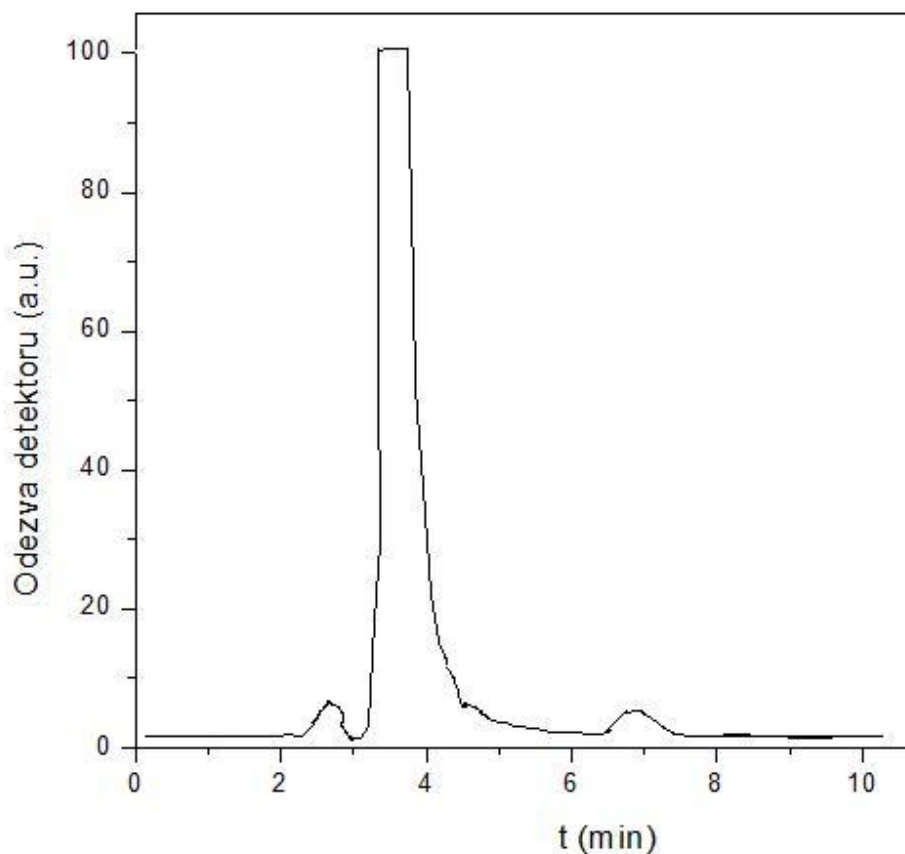
Z Obr. 12 je patrné, že při daném složení a průtoku mobilní fáze, se vedle jednoho píku dihydromyricetinu vyskytuje menší pík nečistot. U tohoto chromatogramu se již může stanovit i přibližný eluční čas ($t_R \approx 1,4$ min) a eluční objem ($V_R \approx 1$ mL).



Obr. 12: Chromatogram dihydromyricetinu, stokrát ředěného; citlivost detektoru: 16; složení mobilní fáze: A:B (75:25) (v:v); průtok mobilní fáze: 0,7 mL/min; detekce při vlnové délce 290 nm; tlak systému: 23 MPa.

Další a mnohem výrazněji interferující píky můžeme sledovat na Obr. 13 (str. 34), kde se objevuje malý pík kolem šesté minuty, (retenční čas (příp. objem), který poukazuje na možný obsah myricetinu (viz oddíl 4.2.2 Chromatogramy myricetinu)). Druhý pík, který naopak eluuje s čelem mobilní fáze, poukazuje spíše na minoritní nečistotu o vysoké polaritě.

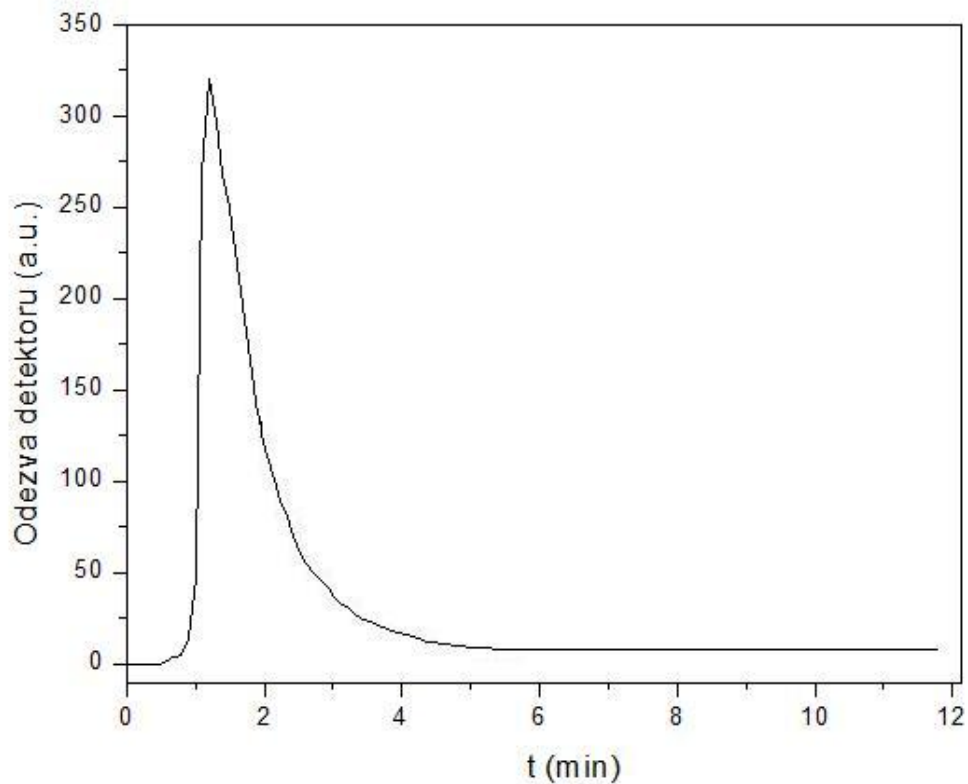
Zde je patrný retenční čas dihydromyricetinu přibližně v třetí minutě a eluční objem se tak pohybuje opět okolo 1 mL.



Obr. 13: Chromatogram dihydromyricetinu, desetkrát ředěného; citlivost detektoru: 16; složení mobilní fáze: A:B (60:40) (v:v); průtok mobilní fáze: 0,3 mL/min; detekce při vlnové délce 290 nm; tlak systému: 15 MPa.

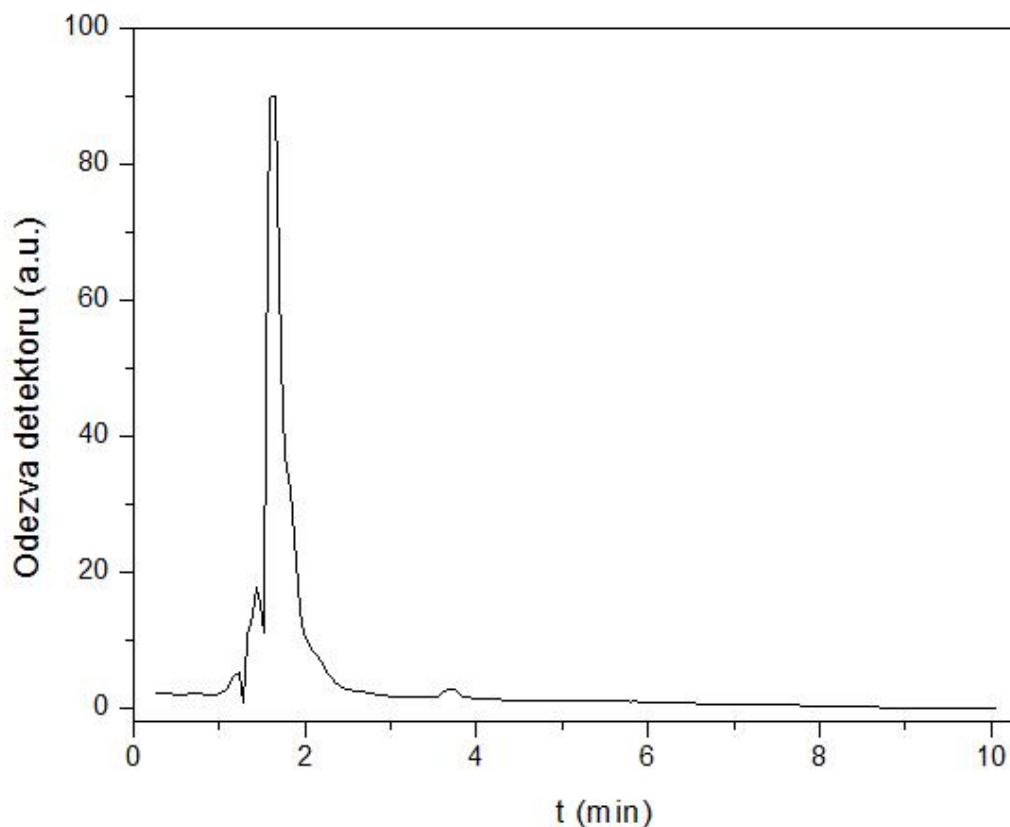
4.2.2 Chromatogramy myricetinu

Podobně jako v případě dihydromyricetinu, také myricetin v této jednoduché mobilní fázi A (pouze čistý methanol) eluuje velmi rychle a nedělí se, jak je dokumentováno na Obr. 14 na následující straně.



Obr. 14: Chromatogram myricetinu, desetkrát ředěného; citlivost detektoru: 4; složení mobilní fáze: 100% A; průtok mobilní fáze: 0,7 mL/min; detekce při vlnové délce 370 nm; tlak systému: 15 MPa.

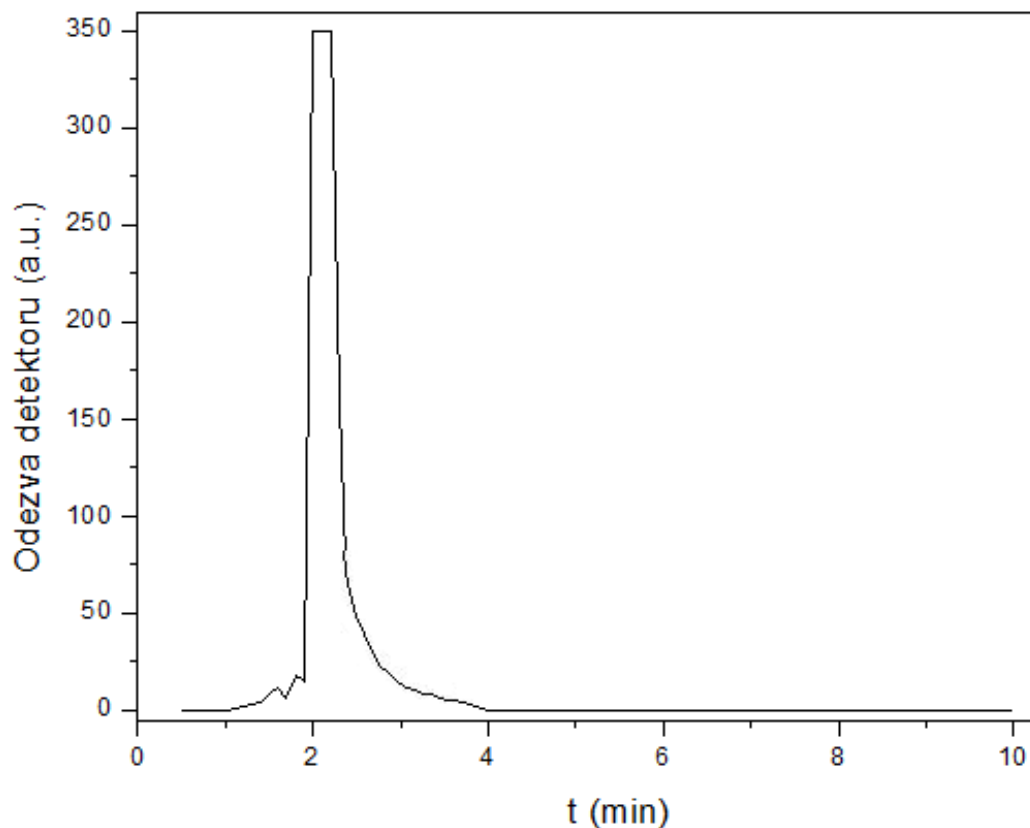
Na Obr. 15 (str. 36) použití směsné mobilní fáze ve složení A:B (75:25) (v:v) již přineslo určitý náznak rozdělení a zvýšení počtu teoretických pater kolony.



Obr. 15: Chromatogram myricetinu, stokrát ředěného; citlivost detektoru: 16; složení mobilní fáze: A:B (75:25) (v:v); průtok mobilní fáze: 0,8 mL/min; detekce při vlnové délce 290 nm; tlak systému: 23 MPa.

Zároveň u Obr. 15 a Obr. 16 (str. 37) lze porovnat detekci při 290 a 370 nm při stejném složení a průtoku mobilní fáze. Je patrné, že při 290 nm se vyskytují vyšší píky interferujících látek, na rozdíl od 370 nm, kdy lze pozorovat poměrně jednotný pík bez interference.

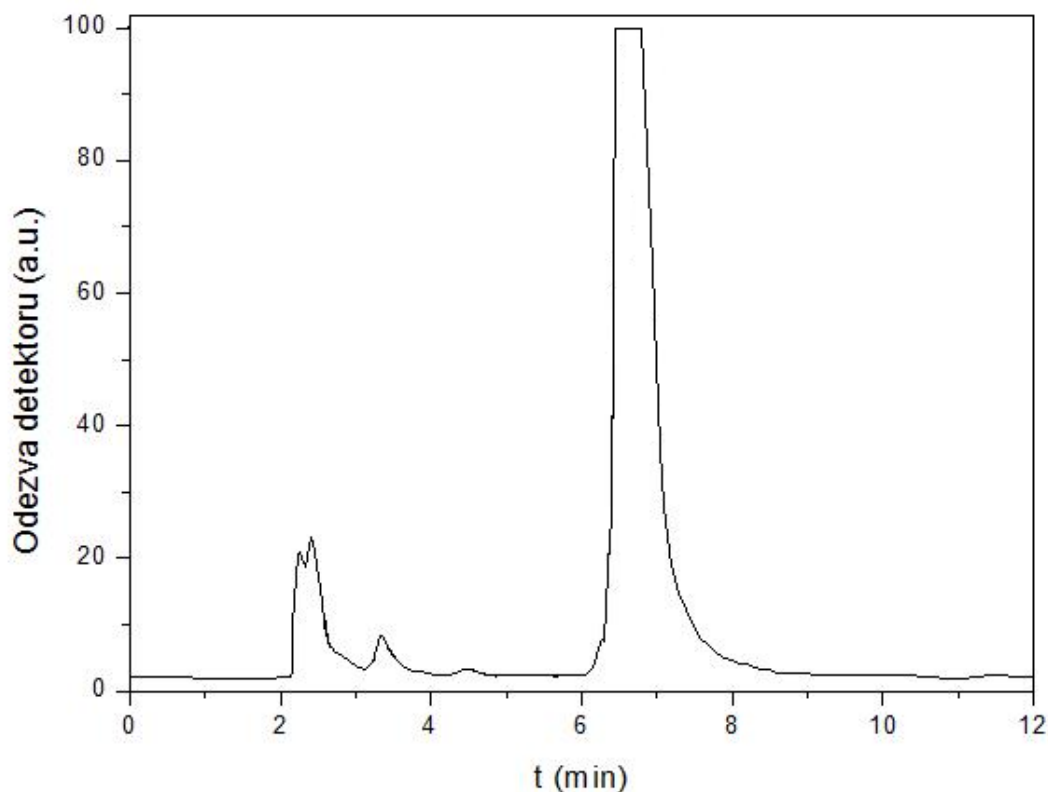
Z chromatogramu na Obr. 16 se může určit přibližný eluční čas ($t_R \approx 2$ min) a eluční objem ($V_R \approx 1,5$ mL).



Obr. 16: Chromatogram myricetinu, stokrát ředěného; citlivost detektoru: 4; složení mobilní fáze: A:B (75:25) (v:v); průtok mobilní fáze: 0,8 ml/min; detekce při vlnové délce 370 nm; tlak systému: 23 MPa.

Poměrně uspokojivého rozdělení bylo dosaženo až použitím isokratické eluce mobilní fází ve složení A:B (60:40) (v:v), což dokazuje chromatogram na Obr. 17 (str. 38).

Dále je na tomto chromatogramu patrná obdobná situace jako u Obr. 13 (viz. str. 34). Kolem předpokládaného retenčního času dihydromyricetinu v případě stejných experimentálních podmínek (tj. eluční čas kolem třetí minuty, příp. eluční objemu okolo 1 mL) se objevuje menší pík, který tak poukazuje jeho minoritní obsah. Samotný myricetin má svůj eluční čas v šesté minutě a eluční objem kolem 2 mL.



Obr. 17: Chromatogram myricetinu, desetkrát ředěného; citlivost detektoru: 16; složení mobilní fáze: A:B (60:40) (v:v); průtok mobilní fáze: 0,3 mL/min; detekce při vlnové délce 290 nm; tlak systému: 15 MPa.

Ze získaných absorpčních spekter a chromatogramů se dá usuzovat, že jsou obě látky poměrně čisté, a to hlavně z hlediska případné přítomnosti jiných flavonoidů, které by také při absorbovaly 290 nm.

Případné minoritní interferující píky mohly náležet externím nečistotám pocházejícím např. z dávkovací smyčky dávkovacího kohoutu či z použití nedokonale čistého laboratorního skla.

Výskyt myricetinu u vzorku dihydromyricetinu či dihydromyricetinu ve vzorku myricetinu naopak může být vysvětlen tím, že během experimentu byly myricetin a dihydromyricetin na kolonu nanášeny v různém pořadí a koncentraci (dávkován byl např. myricetin, desetkrát ředěný a následně dihydromyricetin, stokrát ředěný); mohlo tedy dojít k zanesení látek navzájem. Nelze však vyloučit možný výskyt myricetinu a dihydromyricetinu vedle sebe – v rostlinné říši tomu tak například je u již dříve zmíněné rostliny *Ampelopsis grossedentata* [37], [52].

5 ZÁVĚR

V experimentální části bakalářské práce byla pomocí spektrofotometrie a RP-HPLC dokázána čistota dvou standardních flavonoidní povahy a to dihydromyricetinu a myricetinu. Podle dodaných certifikátů od výrobců k těmto látkám byla čistota u dihydromyricetinu uvedena $\geq 98\%$; u myricetinu $> 97\%$. Z výsledných chromatogramů lze usuzovat, že tyto hodnoty jsou pravdivé a že obě látky dosahují opravdu vysoké čistoty.

6 LITERATURA

- [1] Keller, R. B.: *Flavonoids: Biosynthesis, Biological Effects and Dietary Sources*. New York, Nova Science Publishers, 2009.
- [2] Nijveldt, R. J.; van Nood, E.; van Hoorn, D. EC; Boelens Petra G.; van Norren, K.; van Leeuwen, P. AM: Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition* **74**, 418–425 (2001).
- [3] Rauha, J.-P.; Vuorela, H.; Kostianen, R.: Effect of eluent on the ionization efficiency of flavonoids by ion spray, atmospheric pressure chemical ionization, and atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **36**:12, 1269–1280 (2001).
- [4] Stalikas, C. D.: Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science* **30**:18, 3268–3295 (2007).
- [5] de Rijke, Eva; Out, P.; Niessen, W. M. A.; Ariese, F.; Gooijer, C.; Brinkman, U. A. Th.: Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, **1112**, 31–63 (2006).
- [6] Rice-Evans, Catherine. A.; Miller, N. J.; Paganga, G.: Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolics Acids. *Free Radical Biology & Medicine*, **20**:7, 933–956 (1996).
- [7] Peterson, Julia; Dwyer, Johanna, M. S.: Flavonoids: Dietary Occurrence and Biochemical Activity, *Nutrition Research*, **18**:12, 1995–2018 (1998).
- [8] Crozier, A.; Jaganath, Indu B.; Clifford, M. N.: Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Report*, **26**:8, 1001–1043 (2009).
- [9] Aron, P. M.; Kennedy, J. A.: Compositional investigation of phenolic polymers isolated from *Vitis vinifera* L. Cv. pinot noir during fermentation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**:14, 5670–5680 (2007).

- [10] Crozier, A.; Jaganath, Indu B.; Clifford, M. N.: Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview. In: *Plant Secondary Metabolites. Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. Crozier, A.; Clifford, M. N.; Ashihara, H. (Ed.). Oxford, Blackwell Publishing, 2006, p. 1–24.
- [11] Jaganath, Indu B.; Crozier, A.: Dietary Flavonoids and Phenolic Compounds. In: *Plant Phenolics and Human Health*. Fraga, C. G. (Ed.). New Jersey, John Wiley & Sons, 2010, p. 1–51.
- [12] Shan, B.; Cai, Y. Z.; Sun, M.; Corke, H.: Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**:20, 7749–7759 (2005).
- [13] Gattuso, G.; Barreca, D.; Gargiulli, Claudia; Leuzzi, U.; Caristi, C.: Flavonoid Composition of Citrus Juices. *Molecules*, **12**:8, 1641–1673 (2007).
- [14] Crozier, A.; Lean, M. E. J.; McDonald, M. S.; Black, Christine: Quantitative Analysis of the Flavonoid Content of Commercial Tomatoes, Onions, Lettuce, and Celery. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**:3, 590–595 (1997).
- [15] Sultana, B.; Anwar, F.: Flavonols (kaempferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal plants. *Food Chemistry*, **108**:3, 879–884 (2008).
- [16] <http://web.vscht.cz/~koplikr/Rostlinné_fenoly_a_flavonoidy.pdf> [cit. 6.6.2014]
- [17] Franke, A. A.; Custer, L. J.; Cerna, Carmencita, M.; Narala, Kavitha, K.: Quantitation of Phytoestrogens in Legumes by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **42**:9, 1905–1913 (1994).
- [18] Bohm, B. A.: Shikimic acid (3,4,5-trihydroxy-1-cyclohexene-1-carboxylic acid). *Chemical Reviews*, **65**:4, 435–466 (1965).

- [19] Hermann, K. M.: The Shikimate Pathway: Early Steps in the Biosynthesis of Aromatic Compounds. *The Plant Cell*, **7**:7, 909–919 (1995).
- [20] Kindl, H.; Wöber, B.: *Biochemie rostlin*. Praha, Academia 1981.
- [21] Maeda, H.; Dudareva, Natalia: The Shikimate Pathway and Aromatic Amino Acid Biosynthesis in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, **36**, 73–105 (2012).
- [22] Tzin V.; Galili G.: New Insights into the Shikimate and Aromatic Amino Acids Biosynthesis Pathways in Plants. *Molecular Plant*, **3**:6, 956–972 (2010).
- [23] Vogt, T.: Phenylpropanoid Biosynthesis. *Molecular Plant*, **3**:1, 2–20 (2010).
- [24] Ferrer, J.-L.; Austin, M. B; Stewart, C., Jr.; Noe, J. P.: Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiology and Biochemistry*, **46**:3, 356–370 (2008).
- [25] Flamini, R.; Mattivi, F.; De Rosso, M.; Arapitsas, P.; Bavaresco, L.: Advanced Knowledge of Three Important Classes of Grape Phenolics: Anthocyanins, Stilbenes and Flavonols. *International Journal of Molecular Sciences*, **14**:10, 19651–19669 (2013).
- [26] Rusznyák, S.; Szent-Györgyi, A.: Vitamin P: Flavonols as vitamins. *Nature*, **138**, 27 (1936).
- [27] Mobh, S.: Research for Vitamin P. *The Journal of Biochemistry*, **29**:3, 487–501 (1939).
- [28] Bravo, L.: Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, **56**:11, 317–333 (1998).

- [29] Ratty, A. K.; Das, N. P.: Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: Structure-activity relationship. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology*, **39**:1, 69–79 (1988).
- [30] Torel, J.; Cillard, J.; Cillard, P.: Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochemistry*, **25**:2, 383–385 (1986).
- [31] Block, G.; Patterson, B.; Subar, A.: Fruit, Vegetables, and Cancer Prevention: A Review of the Epidemiologic Evidence. *Nutrition and Cancer*, **18**:1, 1–29 (1992).
- [32] Ross, Julie, A.; Kasum, Christine, M.: Dietary Flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety. *Annual Review of Nutrition*, **22**, 19–34 (2002).
- [33] Lien, E. J.; Ren, S. J.; Bui, H.-H.; Wang, R. B.: Quantitative Structure - Activity Relationship Analysis of Phenolic Antioxidants. *Free Radical Biology & Medicine*, **23**, 285–294 (1999).
- [34] Noroozi, M.; Angerson, W. J.; Lean, M. E. J.: Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *The American Journal of Clinical Nutrition*. **67**:6, 1210–1218 (1998).
- [35] Cook, N. C.; Samman, S.: Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **7**:2, 66–76 (1996).
- [36] Formica, J. V.; Regelson, W.: Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology*, **33**:12, 1061–1080 (1995).
- [37] Zhang, Y.-S.; Zhang, Q.-Y.; Wang, B.; Li, L.-Y.; Zhao, Y.-Y.: Chemical Constituents from *Ampelopsis grossedentata*. *Journal of Chinese Sciences*, **15**:4, 211–214 (2006).
- [38] Shen, Y.; Lindemeyer, K.; Gonzalez, C.; Shao, X. M.; Spigelman, I.; Olsen, R. W.; Liang, J.: Dihydromyricetin As a Novel Anti-Alcohol Intoxication Medication. *Journal of Neuroscience*, **32**:1, 390–401 (2012).

- [39] Muñoz, N. C.; Alonso, S. G.; Romero, E. G.; Gutiérrez, I. H.: Flavonol Profiles of *Vitis vinifera* Red Grapes and Their Single-Cultivar Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**:3, 992–1002 (2007).
- [40] Knekt, P.; Kumpulainen, J.; Järvinen, R.; Rissanen, H.; Heliövaara, M.; Reunanen, A.; Hakulinen, T.; Aromaa, A.: Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *American Journal of Clinical Nutrition*, **76**:3, 560–568 (2002).
- [41] Nöthlings, U.; Murphy, S.; Wilkens, L. R.; Henderson, B. E.; Kolonel, L. N.: Flavonols and pancreatic cancer risk - The multiethnic cohort study. *American Journal of Epidemiology*, **166**:8, 924–931 (2007).
- [42] Katalog produktů APIChem Technology. Dostupný z URL:
<<http://chemmol.com/chemmol/suppliers/apichemistry/texts.php>> [cit. 16.8.2014]
- [43] Khoddami, A.; Wilkes, M. A.; Roberts, T. H.: Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules*, **18**:2, 2328–2375 (2013).
- [44] Bloor, S. J.: Overview of Methods for Analysis and Identification of Flavonoids. In: *Methods in Enzymology, Vol. 335, Flavonoids and Other Polyphenols*. Packer L. (Ed.). California, Academic Press, 2007, p. 3–14.
- [45] Liu, E.-H.; Qi, L.-W.; Cao, J.; Li, P.; Li, C.-Y.; Peng, Y.-B.: Advances of Modern Chromatographic and Electrophoretic Methods in Separation and Analysis of Flavonoids. *Molecules*, **13**:10, 2521–2544 (2008).
- [46] Lee, B. L.; Ong, C. N.: Comparative analysis of tea catechins and theaflavins by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, **881**:1-2, 439–447 (2000).
- [47] Jeon, S. H.; Chun, W.; Choi, Y. J.; Kwon, Y. S.: Cytotoxic Constituents from the Bark of *Salix hulteni*. *Archives of Pharmacal Research*, **31**:8, 978–982 (2008).

[48] Korul'ka, L. M.; Shul'ts, E. E.; Zhusupova, G. E.; Abilov, Zh. A.; Erzhanov, K. B.; Chaudri, M. I.: Biologically active compounds from *Limonium Gmelinii* and *L. Popovii*. I. *Chemistry of Natural Compounds*, **40**:5, 465–471 (2004).

[49] <<http://web.natur.cuni.cz/analchem/pprakt/ds.pdf>> [cit. 16.7.2014]

[50] Justesen, U.; Knuthsen, P.; Leth, T.: Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, **799**:1-2, 101–110 (1998).

[51] Toyoda, M.; Tanaka, K.; Hoshino, K.; Akiyama, H.; Tanimura, A.; Saito, Y.: Profiles of Potentially Antiallergic Flavonoids in 27 Kinds of Health Tea and Green Tea Infusions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**:3, 2561–2564 (1997).

[52] Zhang, Y.-S.; Zhang, Q.-Y.; Li, L.-Y.; Wang, B.; Zhao, Y.-Y.; Guo, D.-A.: Simultaneous determination and pharmacokinetic studies of dihydromyricetin and myricetin in rat plasma by HPLC-DAD after oral administration of *Ampelopsis grossedentata* decoction. *Journal of Chromatography B*, **860**:1, 4–9 (2007).