

UNIVERZITA KARLOVA
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

**Stanovení floridzinu a jiných fenolických látek
v listech jabloní pomocí HPLC**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce: **Bc. Anežka Adamcová**

Vedoucí práce: **Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.**

Hradec Králové, 2018

Prohlášení

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

Souhlasím, aby byla práce půjčována ke studijním účelům a byla citována dle platných norem.

V Hradci Králové

Anežka Adamcová

Poděkování

Ze všeho nejvíce bych upřímně poděkovala doc. RNDr. Daliborovi Šatínskému, Ph.D. za jeho velkou vstřícnost, trpělivost, profesionální a milé jednání a odborné rady, které mi ochotně sděloval. Děkuji mu za řešení problémů, se kterými jsme se setkávali a za čas, který mi věnoval při častých konzultacích a měřeních. Taky jsem moc vděčná za jeho pozitivní povahu, která vytvářela příjemné pracovní podmínky.

Dále moc děkuji doc. Ing. Alešovi Hornovi, CSc. a PharmDr. Viktorovi Voříškovi z výzkumné laboratoře Ranadal s.r.o., kde jsem díky této práci mohla navázat spolupráci a děkuji jim za odborné rady spojené s problematikou diplomové práce.

Všem třem pánům děkuji za povzbuzující přístup, který mě motivoval a dodával zájem pro tvorbu této práce.

Děkuji své rodině, přátelům a známým za podporu během studia. Velké díky patří i mým spolužákům za zpříjemnění vysokoškolských let.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Bc. Anežka Adamcová

Školitel: Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D

Název: Stanovení floridzinu a dalších fenolických látek v listech jabloní pomocí HPLC

Tato diplomová práce je rozdělena na teoretickou a praktickou část. Teoretická část se zabývá charakterizací floridzinu a praktická část je zaměřena na HPLC stanovení floridzinu, floretinu, kyseliny chlorogenové a kvercitrinu v listech různých odrůd jabloní. Rovněž byly charakterizovány tyto látky v pupenech a kůře jabloní. Práce se zabývá optimalizací a validací nově vytvořené chromatografické metody.

K analýze byla použita kolona YMC-Triart C18 ExRS 150 x 4,6 mm x 5 μ m, 8 nm. Byla využita gradientová eluce s mobilní fází tvořenou organickou složkou (ACN) a vodnou složkou s kyselinou fosforečnou (pH = 2,2). K detekci byl využit DAD detektor při vlnových délkách 280 nm, 327 nm a 354 nm. Teplota kolonového prostoru byla 30 °C, nástřik byl 1 μ l a průtoková rychlost 1 ml/min.

Byly separovány a identifikovány fenolické látky ze vzorků listů pocházejících z různých odrůd rodu *Malus*. Každá odrůda byla extrahována ve 2 typech extrakčního činidla pro zjištění účinnějšího.

Teoretická část se kromě charakterizace fenolických látek zabývá chemickou strukturou floridzinu, jeho biosyntézou, osudem v organismu a možnostmi extrakce. Jsou uvedeny nejnovější studie o využití a vztahu k diabetes. Kromě toho se teoretická část zabývá popisem HPLC metody a možnostem detekce fenolických látek.

Klíčová slova: HPLC, floridzin, floretin, kyselina chlorogenová, kvercitrin, rutin, listy, extrakce

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Bc. Anežka Adamcová

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

Title of Diploma Thesis: Determination of floridzin and other phenolic compounds in apple leaves by HPLC

This diploma thesis is divided to theoretical and experimental part. The theoretical part is focused on phloridzin and its characterization. In the experimental part the phloridzin, phloretin, chlorogenic acid, rutin and quercitrin were analyzed with a high performance liquid chromatography (HPLC) method from leaves of genus *Malus*. These compounds were identified in barks and buds of apple trees. The experimental part deals with optimization and validation of method too.

Column YMC-Triart C18 ExRS 150 x 4.6 mm x 5µm, 8 nm and gradient elution consisting of organic part of ACN and water part with phosphoric acid (pH= 2.2) was used for analysis. The detection was performed by DAD detector at wavelengths 280 nm, 327 nm a 354 nm. The temperature of column space was 30 °C, injection volume was 1 µl and flow rate 1 ml/min.

Phenolic compounds from apple leaves originating from various cultivars were separated and identified. Each cultivar was extracted by 2 types of extraction reagents (methanol with formic acid or acetic acid) to find out which one is more effective. Concentrations of phenolic compounds in bark and buds were determined too.

The theoretical part except the characterization of phenolic compound deals with phloridzin and its chemical structure, biosynthesis, behavior in organism and possibilities in extractions. The latest studies about utilization and its potential effect on diabetes mellitus type 2 are mentioned. HPLC method and types of detections are described too.

Key words: HPLC, phloridzin, phloretin, chlorogenic acid, quercitrin, rutin, apple leaves, extraction

OBSAH

1. Seznam zkratek.....	9
2. Úvod	11
3. Cíl a zadání práce	12
4. Teoretická část.....	13
4.1. Charakteristika jabloně.....	13
4.2. Charakteristika fenolických látek.....	13
4.3. Floridzin	15
4.4. Biosyntéza floridzinu	15
4.5. Osud v organismu	16
4.6. Výskyt floridzinu v <i>Malus</i> sp.....	17
4.6.1. Výskyt v listech jabloní.....	18
4.6.2. Výskyt v jiných plodech.....	19
4.7. Význam floridzinu a dalších fenolických látek.....	20
4.7.1. Efekt floridzinu při léčbě diabetes mellitus 2. typu	20
4.7.2. Efekt floridzinu na postprandiální zvýšení glukózy.....	21
4.7.3. Antihyperglykemické účinky floridzinu u dobrovolníků.....	21
4.7.4. Efekt floridzinu při léčbě poškození jater	22
4.7.5. Vliv jablek na složení lidského střeva.....	22
4.7.6. Další využití ve farmaceutickém průmyslu.....	23
4.8. Extrakce fenolických látek	23
4.8.1. Magnetické molekulárně vtištěné polymery (MMIPs)	25
4.8.2. Kvantifikace fenolických látek z rostlinné matrice.....	26
4.9. Princip chromatografie.....	26
4.9.1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	27
4.9.1.1. Blokové schéma a popis	27
4.9.2. Spektrofotometrické detektory	28

4.9.3. Elektrochemické detektory.....	28
4.9.4. CoulArray detektor.....	28
4.9.5. Základní chromatografické veličiny	30
4.10. Validace chromatografické metody	30
4.10.1. Kdy se provádí validace.....	30
4.10.2. Validací parametry.....	31
4.11. Příklady předchozích studií pro stanovení fenolických látek v <i>Malus</i> sp...	32
5. Experimentální část	33
5.1. Přístroje a podmínky separace	33
5.2. Chemikálie	33
5.3. Příprava roztoků	34
5.3.1. Příprava roztoků standardů	34
5.3.2. Příprava zásobních roztoků pro kalibraci.....	34
5.3.3. Příprava pracovních roztoků pro kalibraci.....	34
5.3.4. Příprava zásobního roztoku pro výtěžnost	36
5.3.5. Příprava pracovních roztoků pro výtěžnost.....	36
5.3.6. Příprava pracovních roztoků pro přesnost.....	36
5.3.7. Příprava pracovních roztoků pro test opakovatelnosti	36
5.4. Postup extrakce fenolických sloučenin ze vzorků listí (kůry, pupenů)...	37
6. Výsledky a diskuze.....	38
6.1. Volba vlnové délky	38
6.2. Volba kolony.....	41
6.3. Identifikace jednotlivých fenolických látek	42
6.4. Validace analytické metody	43
6.4.1. Test vhodnosti chromatografického systému.....	43
6.4.2. Linearita	43

6.4.2.1.	Kalibrační závislost pro floretin	44
6.4.2.2.	Kalibrační závislost pro kyselinu chlorogenovou.....	45
6.4.2.3.	Kalibrační závislost pro rutin.....	46
6.4.2.4.	Kalibrační závislost pro kvercitrin.....	47
6.4.2.5.	Kalibrační závislost pro floridzin	48
6.4.3.	Opakovatelnost.....	49
6.4.4.	Výtěžnost.....	51
6.4.5.	Přesnost	52
6.5.	Stanovení obsahu fenolických sloučenin v listech jabloní.....	53
6.5.1.	Stanovení fenolických látek v kůře jabloní.....	60
6.5.2.	Stanovení fenolických látek v pupenech jabloní.....	62
6.5.3.	Srovnání obsahu fenolických látek v jednotlivých částech stromu u různých odrůd	65
6.5.4.	Srovnání obsahu floridzinu v jednotlivých částech stromu u různých odrůd	67
7.	Závěr a diskuze.....	68
8.	Seznam obrázků.....	70
9.	Seznam tabulek.....	71
10.	Zdroje	74

1. SEZNAM ZKRATEK

ABTS	2,29-azinobis-(3-etylbenzotiazoline-6-sulfonová kyselina)
ASE	zrychlená extrakce rozpouštědlem
CHS	chalkon-syntáza
DAD	detektor s diodovým polem
DH	dehydrogenáza
DM	diabetes mellitus
EA	extrakce metanolem
EB	suchý extrakt
EC	etylacetátová extrakce
ECD	elektrochemický detektor
ED	extrakce vodou
GLUT	glukózový transportér
HPLC	vysokoúčinná kapalinová extrakce
MASE	extrakce podporována mikrovlnným ohřevem
MF	mobilní fáze
MMIPs	magnetické molekulárně vřišťené polymery
MS	hmotnostní spektrometrie
MTX	metotrexát
MRSA	methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
MIC	minimální inhibiční koncentrace
NMR	nukleární magnetická rezonance
OGTT	orální glukózový toleranční test
P2'GT	floretin-2'-O-glykosyltransferáza
RP	reverzní fáze
RSD	relativní směrodatná odchylka
SD	směrodatná odchylka
SGLT	sodíkovo-glukózový transportér
SF	stacionární fáze
SPE	extrakce na pevné fázi
UAE	extrakce ultrazvukem
UDP	uridindifosfát

UV	ultrafialové záření
VIS	viditelné záření

2. ÚVOD

Jablka jsou od nepaměti součástí našeho jídelníčku. Konzumují se v syrovém stavu, ve formě džusů, moštů, džemů a jsou neodmyslitelnou součástí kompotů, moučníků či čajů.

Z hlediska nutriční hodnoty jablka obsahují mnoho cenných a zdraví prospěšných biologicky aktivních látek. Dále obsahují vodu, cukry, tuky, bílkoviny, vlákninu. Jablka jsou zdrojem fenolických látek, patřících do skupiny přírodních antioxidantů. Jejich konzumace snižuje riziko karcinogeneze, kardiovaskulárních chorob, neurodegenerativních onemocnění a chrání tělo proti infekcím. Tyto fenolické látky se nachází v různých částech rostlin, takže kromě plodů se nachází také v kořenech, kůře a listech. Právě v listech se nachází mnoho fenolických látek, z nichž nejvyšší zastoupení tvoří floridzin. Problematikou floridzinu se v teoretické části zabývá tato diplomová práce.

Pro stanovení fenolických látek se často využívá vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), která umožňuje rozdělení jednotlivých fenolických látek zároveň s možností jejich současné kvantifikace. Tato metoda byla využita i v diplomové práci k analýze fenolických látek v listech, kůře a pupenech jabloní.

3. CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE

Cílem experimentální části této práce bylo HPLC stanovení floridzinu, floretinu, kyseliny chlorogenové, rutinu a kvercitrinu – tedy fenolických látek v listech různých odrůd rodu *Malus* a jejich porovnání s kůrou a pupeny. Dalším cílem byla optimalizace a validace vyvinuté chromatografické metody a určení vhodného extrakčního činidla pro analyzované látky.

Cílem teoretické části bylo kromě základní charakteristiky fenolických látek uvést nejnovější poznatky o floridzinu – jeho biosyntézu, osud v organismu, využití, extrakci a možnosti stanovení této látky.

4. TEORETICKÁ ČÁST

4.1. Charakteristika jabloně

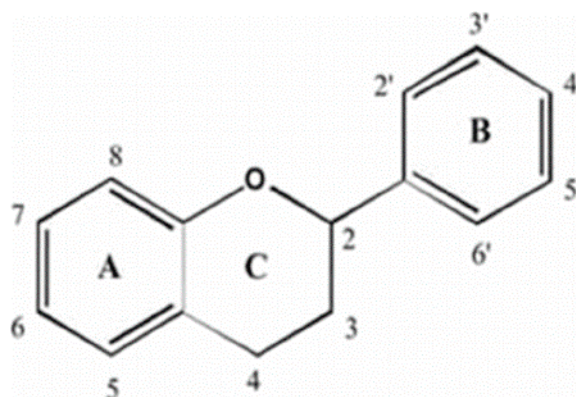
Jabloň patří do říše *Plantae* (rostliny), podříše *Tracheobionta* (cévnaté rostliny), oddělení *Magnoliophyta* (krytosemenné), třída *Rosopsida* (dvouděložné), řád *Rosales* (ružotvaré), čeleď *Rosaceae* (ružovité), podčeleď *Maloideae* (jabloňovité), rod *Malus* (jabloň).

Jablka patří mezi nejčastěji konzumovaná ovoce. Z větší části obsahují vodu (85 %). Mezi hlavní třídy potenciálně přínosných složek patří: vláknina, vitamíny (zejména vitamín C a vitamín E), minerály (draslík) a fenolické sloučeniny. Mezi základní jablečné produkty patří jablečný džus, cider, ocet [1].

4.2. Charakteristika fenolických látek

Fenoly tvoří velkou skupinu sloučenin s různou strukturou. Nachází se v různých rostlinných druzích a množství fenolických látek se liší v různých částech rostlin. Zdrojem těchto látek pro člověka jsou ovoce a zelenina. Lze je rozdělit do tří základních skupin: neflavonoidní, flavonoidní, ostatní. Jedná se o organické látky, které obsahují minimálně jedno aromatické jádro a hydroxylové skupiny. Jsou to produkty sekundárního metabolismu rostlin. Zajišťují barvu květů, plodů, semen. U jablka jsou nositelem červené barvy slupky antokyanová barviva, světle žlutou barvu zajišťují flavonoly, dihydrochalkony a další fenolové sloučeniny [2, 3].

Základní strukturu flavonoidů tvoří flavan (obr. č. 1), jehož dvě benzenová jádra (A, B) jsou spojená třemi uhlíky a ty spolu s kyslíkem tvoří heterocyklus (2H-pyran).



Obrázek č. 1: Struktura flavanu [5]

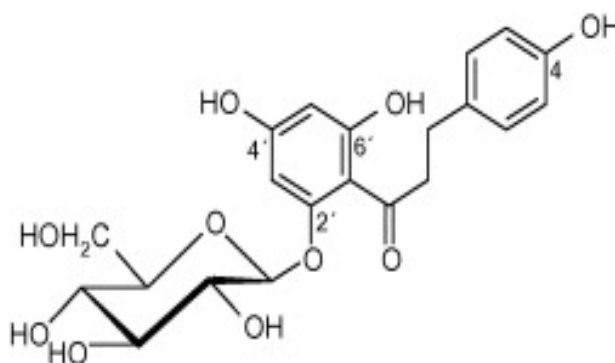
Flavonoidy jsou dle struktury klasifikovány do několika skupin: katechiny, leukoanthokyanidiny, flavanony, flavanonoly, flavony, flavonoly, anthokyanidiny, isoflavonoidy. Existují případy, kdy heterocyklický kruh C existuje v otevřené formě, pak se jedná o chalkony a dihydrochalkony. U auronů je tento kruh nahrazen pětičlenným heterocyklickým kruhem. Bylo popsáno více než 6000 látek a toto číslo stále roste. Přehled fenolických sloučenin nacházejících se v jablcích je vyobrazen v tabulce č. 1. [2, 3, 4].

Tabulka č. 1: Fenolové sloučeniny v jablku [6]

Flavonoidy			
Antokyaniny	Dihydrochalkony	Flavanoly	Flavonoly
Kyanidin-3-O-arabinosid	3-Hydroxyflorethin-2-O-glukosid	Katechin	Quercetin-3-arabinopyranosid
Kyanidin-3-O-galaktosid	Floridzin	Epikatechin	Quercetin-3-arabinofuranosid
Kyanidin-3-O-xylosid	Florethin	Prokyanidin B1	Quercetin-3-O-galaktosid
	Phlorethin-2-xyloglukosid	Prokyanidin B2	Quercetin-3-O-glukosid
		Prokyanidin C1	Quercetin-3-O-rhamnosid
		Prokyanidin-tetramer	Quercetin-3-O-rutinosid
		Prokyanidin-pentamer	Quercetin-3-O-xylosid
			Quercetin (aglykon)
Fenolové kyseliny			
Hydroxybenzoová kyselina	Syringová kyselina	Hydroxyskořicová kyselina	Kávoová kyselina
4-p-kumarylchinová kyselina	4-kafeylchinová kyselina	Ferulová kyselina	p-kumarinová kyselina

4.3. Floridzin

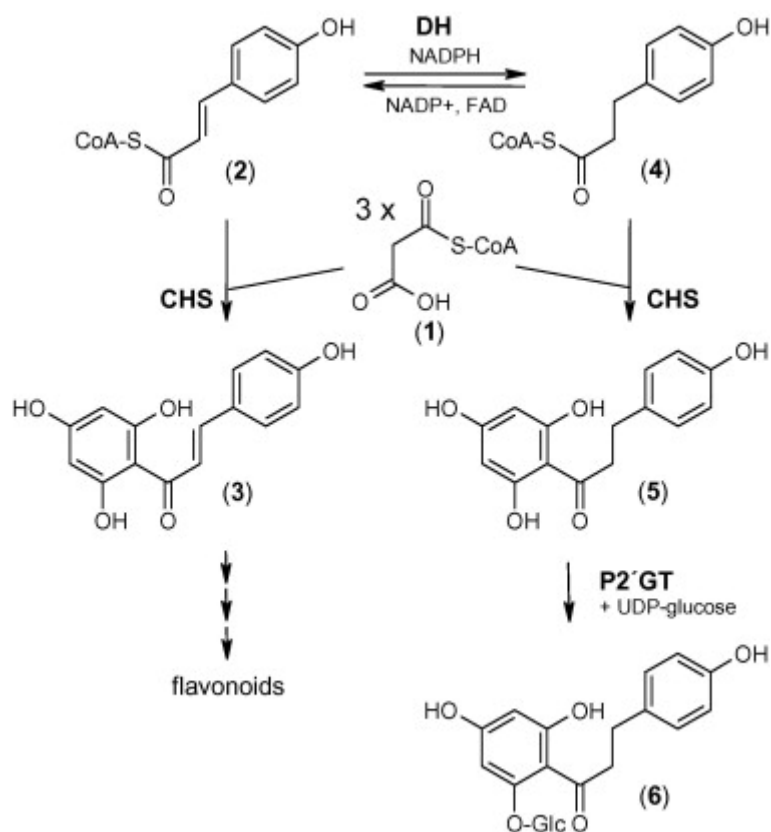
Floridzin je flavonoid, který byl poprvé izolován v roce 1835 z kůry jabloní. Název floridzin (řecky: *φλοιός* = kůra, *ρίζα* = kořen) byl zvolen z důvodu vyšší koncentrace v kořenové kůře. Má hořkou chuť. Patří do chemické třídy dihydrochalkonů, na kterém je v poloze 2' navázaná β -D-glukopyranosa (obr. č. 2). Dihydrochalkony jsou charakterizovány přítomností dvou benzenových jader, které jsou spojeny tříuhlíkatým řetězcem a na rozdíl od chalkonů je redukována dvojná vazba. Aglykon floridzinu se nazývá floretin [7, 8].



Obrázek č. 2: Struktura floridzinu

4.4. Biosyntéza floridzinu

Biosyntéza floridzinu je zčásti znázorněna na obrázku č. 3. Začíná aminokyselinou fenylalaninem. Tento prekurzor vzniká tzn. šikimátovou cestou. Následně enzym fenylalanin-amoniak-lyáza odstraňuje amino-skupinu a vzniká kyselina skořicová, ta je enzymem cinamát 4-hydroxyláza přeměněna na kyselinu kumarovou. Enzym 4-kumarát-CoA ligáza mění kyselinu kumarovou na p-kumarylkoenzym A (2). Jeho kondenzací s třemi molekulami malonylkoenzymu A (1) vzniká naringeninový chalkon (3). Tato reakce je katalyzována enzymem chalkon-syntáza (CHS). Následně dochází k syntéze flavonoidů. Působením dehydrogenázy (DH) na p-kumarylkoenzym A (2) vzniká p-dihydrokumarylkoenzym A (4) a jeho kondenzací s třemi molekulami malonylkoenzymu A (1) vzniká floretin (5). Posledním krokem je glykosylace floretinu za účasti floretin-2'-O-glykosyltransferázy (P2'GT) a produktem je floridzin (6) [9, 10].



Obrázek č. 3: Biosyntéza floridzinu [10]

4.5. Osud v organismu

Hlavním místem resorpce je tenké střevo. V tenkém střevě se nachází enzym laktáza-floridzin hydroláza (LPH). Nachází se na vnější straně membrány kartáčového lemu enterocytů. Jeho působením vzniká z floridzinu aglykon – floretin, který se absorbuje střevní stěnou [11].

Teorii potvrzuje studie, u které byly využity myši po perorálním podání floridzinu a floretinu. Následně byl odebrán vzorek plazmy a podroben HPLC analýze. V plazmě myši krmených floridzinem nebyl floridzin detekován a to vlivem LPH, který floridzin hydrolyzoval ještě před absorpcí. Naopak floretin (v konjugované formě) se v plazmě vyskytoval u myši krmených floretinem i floridzinem [12].

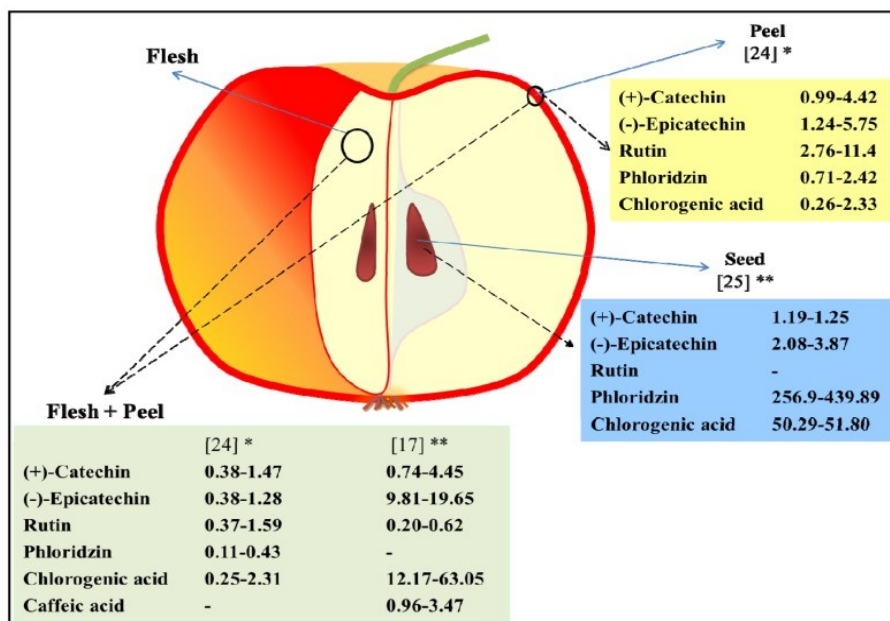
Další studie zjišťovala účinek orálně podaného floridzinu u diabetických myši. Došlo ke snížení krevní glukózy a metodou HPLC byla zjištěna plazmatická koncentrace floretinu a floridzinu a jejich metabolitů. V plazmě byl nalezen floridzin o velmi nízké koncentraci a floretin o koncentraci až 30krát vyšší než floridzin. což taky svědčí o přeměně floridzinu na jeho aglykon, který se v tomto

stavu absorbuje střevní stěnou a jen malé množství floridzinu se dostává do organismu. [13]

V tenkém střevě se nachází SGLT1 transportér, který transportuje glukózu a galaktózu. Floridzin způsobuje inhibici tohoto transportéru, a proto využití p.o. floridzinu spočívá v prevenci vzniku DM2 (viz kapitola 4.7. - Význam floridzinu a dalších fenolických látek).

4.6. Výskyt floridzinu v *Malus* sp.

Floridzin se společně s ostatními fenolickými látkami typicky nachází u botanického rodu *Malus* (jabloň). Jeho aglykon, floretin, se zde rovněž nachází, ale ne v tak velkém množství jako floridzin [6]. Dle různých studií se floridzin vyskytuje ve všech částech jablka (obr. č. 4) – ve slupce, dužině, semínkách [14, 15], dále i v listech a kůře jabloně. Množství a zastoupení těchto fenolických látek závisí na odrůdě jablka, skladování a zpracování. Rovněž existují měření, která prokázala přítomnost fenolických sloučenin, včetně floridzinu, v jablečných produktech – v džusu (čistý, zakalený) a v jablečných pyré. Výrobou těchto produktů došlo ke snížení fenolických sloučenin [16].



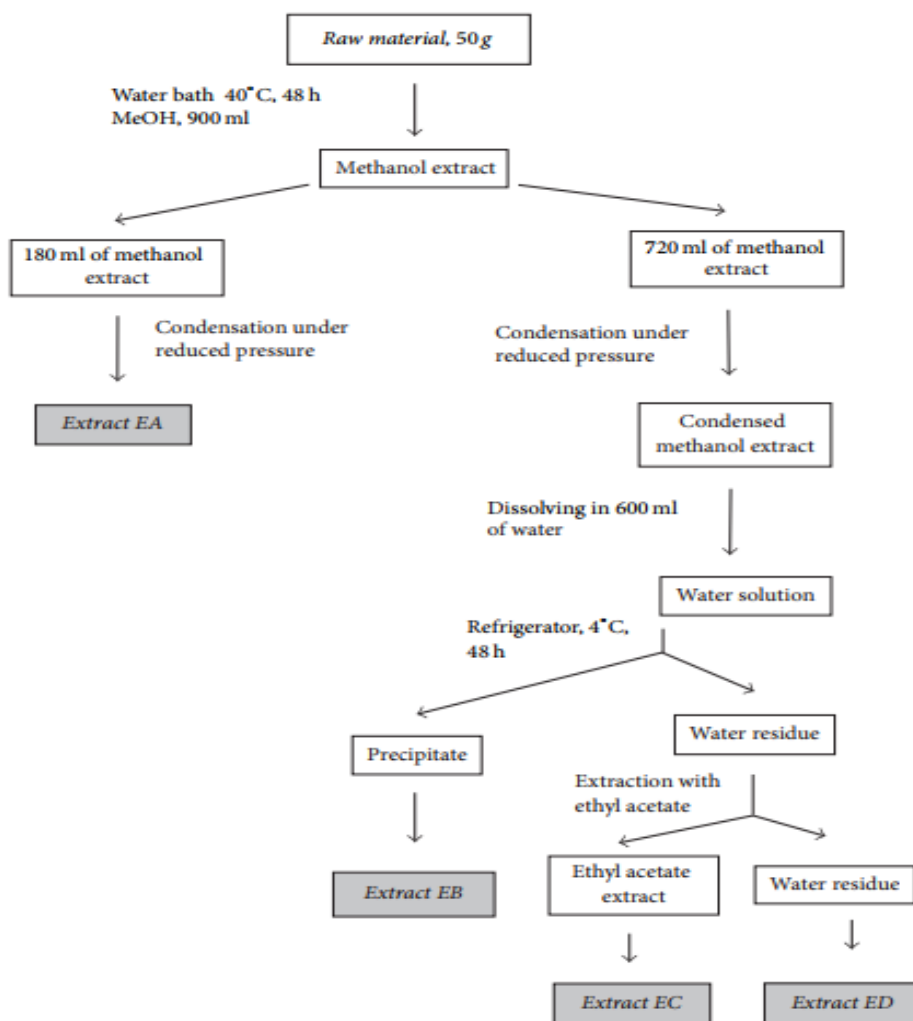
Poznámka: * mg/g, **mg/100g

Obrázek č. 4: Schéma zastoupení fenolických látek v jablku [17]

4.6.1. Výskyt v listech jabloní

Není až tak známo, že mnoho fenolických látek se nachází i v listí jabloní. Listí je odpadní produkt, a proto by mohl být využit jako dostupný materiál pro přípravu kosmetických produktů či potravinových suplementů obohacených o fenolické sloučeniny. Listy jabloní jsou bohaté na fenolické sloučeniny, hlavně flavonoidy. Ukázalo se, že převládající složkou je opět floridzin [17].

Studie z roku 2016 zjišťuje obsah fenolických látek z různých odrůd. Schéma extrakce je vyobrazeno na obr. č. 5. K odstranění balastních hydrofobních látek byla použita metoda SPE. HPLC analýza ukázala, že hlavní fenolickou frakcí byly flavonoidy s nejvyšším množstvím floridzinu. U metanolové (EA) extrakce se floridzin nejvíce vyskytoval u odrůdy „Ligol“ (299 mg/g). U etylacetátové (EC) extrakce se floridzin nejvíce vyskytoval v odrůdě „Golden Delicious“ (603 mg/g). U ostatních typů extrakce bylo množství floridzinu výrazně nižší [22 mg/g]. Nejvyšší hodnoty byly pozorovány u floridzinu [18].



Obrázek č. 5: Schéma extrakce [18]

I další studie z roku 2016 analyzovala fenolické látky v listech jabloní. Součástí studie bylo porovnání extrakce metanolem a etanolem. Metodou RP-HPLC-DAD se zjišťovalo množství fenolických látek v jednotlivých typech extrakcí (tab. č. 2). Nejvyšší zastoupení tvořil floridzin a největší výtěžnosti bylo dosaženo použitím 70% etanolu [19].

Tabulka č. 2: Zastoupení fenolických látek v jednotlivých extrakcích

rozpouštědlo	Epikatechin (mg/g)	Quercetin (mg/g)	Floridzin (mg/g)	Floretin (mg/g)	Quercitrin (mg/g)
50% metanol	0.46 ± 0.02	1.53 ± 0.003	21.90 ± 0.02	0.17 ± 1.13	1.75 ± 0.02
70% metanol	0.28 ± 0.005	1.55 ± 0.002	18.79 ± 0.08	0.12 ± 0.29	1.56 ± 0.03
100% metanol	0.26 ± 0.002	1.60 ± 0.001	22.68 ± 0.10	0.15 ± 0.77	1.93 ± 0.02
70% etanol	0.37 ± 0.07	1.55 ± 0.001	24.43 ± 0.05	0.15 ± 0.05	2.06 ± 0.05
50% etanol	0.31 ± 0.02	1.19 ± 0.002	21.07 ± 0.06	0.13 ± 0.07	1.50 ± 0.001
100% etanol	0.07 ± 0.001	0.50 ± 0.034	19.67 ± 0.07	0.16 ± 0.05	0.81 ± 0.009

Další výzkum z roku 2014 rovněž analyzoval obsah fenolických látek v listech jabloně. Závěrem studie bylo zjištění, že hlavní fenolickou složkou byl floridzin a to v procentuálním množství 76,9 % - 84,2 % ze všech fenolických látek. K extrakci byl využit etanol. Analýza proběhla metodou HPLC-PDA [20].

4.6.2. Výskyt v jiných plodech

Floridzin se nachází i v jahodách. Studie zjišťovala výskyt floridzinu ve 3 kultivarech jahod. Metodou HPLC-PDA-MS/MS a NMR spektroskopie bylo zjištěno množství floridzinu v rozmezí 1.9 - 4.9 mg/100 g v sušině [21]. Floridzin se dále vyskytuje se i v kůře hrušky, nikoliv v plodech [22]. Přítomnost se prokázala i v šípících [23].

4.7. Význam floridzinu a dalších fenolických látek

Studie ukazují, že příjem flavonoidů snižuje riziko koronárních onemocnění [24], působí protizánětlivě, redukuje hladinu triglyceridů v krvi a lipoproteiny s nízkou hustotou [25], snižuje riziko karcinogeneze [26]. Kromě toho se floridzin podílí na velké skupině fyziologických procesů, jako zesílení buněčných stěn, ochrana před oxidačním stresem [27]. Přítomnost dihydrochalkonů slouží také k detekci jablečných šťáv v jiných ovocných šťávách [4].

4.7.1. Efekt floridzinu při léčbě diabetes mellitus 2. typu

Charakteristickým rysem DM2 je porucha citlivosti periferních tkání k účinku inzulinu a někdy i snížená sekrece insulínu beta-buňkami. Důsledkem je hyperglykémie a hyperinsulinémie. Diabetes mellitus je potvrzen při laboratorním změření koncentrace glukózy v plazmě na lačno. Tato hodnota je vyšší nebo rovna 7,0 mmol/l [28].

Jeden z terapeutických přístupů při léčbě DM2 je inhibice transportéru SGLT 2, což vede k indukci glykosurie. Tato tzn. glukuretika zbavují organismus nadbytečné glukózy zamezením reabsorpce glukózy v ledvinách a redukují hyperglykémii.

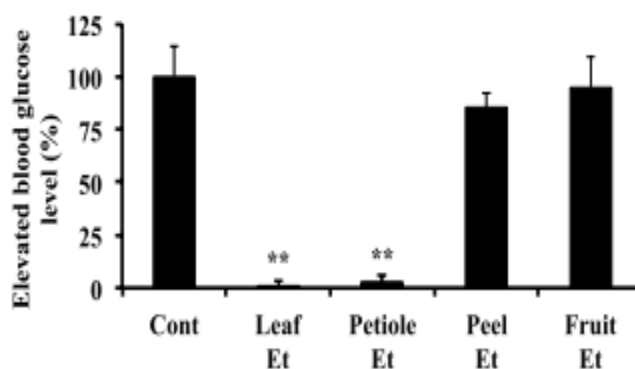
Floridzin je prvním známým přirozeně se vyskytujícím neselektivním inhibitorem glukozových transportéru SGLT. Způsobuje blokádu reabsorpce glukózy v proximálních tubulech ledvin (SGLT2) a v tenkém střevě (SGLT1). Už ve 30. letech 20. století se objevila informace, že floridzin blokuje renální absorpci glukózy. První studie zaměřena na využití inhibice SGLT2 v léčbě diabetu pochází z 80. let 20. století. Během ní došlo k normalizaci glykémie a snížení glukotoxicity u potkanů a to po subkutánním podávání floridzinu. Kromě toho floridzin snížil jaterní produkci glukózy. Po ukončení substituce floridzinem došlo k opětovnému zvýšení glykémie. Nicméně vzhledem k neselektivitě je farmakoterapeutické využití floridzinu limitováno, protože způsobuje malabsorpci glukózy a galaktózy. Navíc jeho metabolit (florethin) inhibuje glukózový transportér GLUT1. To vede ke snaze objevení analogů floridzinu a vyvinout selektivní SGLT2 inhibitor [29, 30].

Následkem toho byly syntetizovány a testovány O-glukosidické analogy floridzinu, například T-1095, sergliflozin, remogliflozin. Jejich nevýhodou byla stále nízká farmakokinetická stabilita a nedostatečná selektivita pro SGLT2. V roce

2008 byl objeven Dapagliflozin, C-glykosid floridzinu, a v 2012 byl schválen pro léčbu DM2. Nedlouho poté došlo k uvedení na trh i jiných analogů floridzinu [8].

4.7.2. Efekt floridzinu na postprandiální zvýšení glukózy

Studie poukazuje na anti-hyperglykemickou aktivitu u myši. Efekt z výtažku listů jablek na postprandiální krevní glukózu byl zkoušen u myši, kterým byl nejprve odepřen přísun potravy po dobu 24 hodin a následně podán roztok cukrů (1 mg/kg), a to společně s výtažkem listů jablek (1 mg/kg) nebo bez. Ukázalo se, že u myši, kterým byl podán výtažek z jablek, došlo k výraznému snížení krevní glukózy. Také se hodnotil efekt jiných částí jabloně (řapík, slupka, ovoce) na postprandiální zvýšení krevní glukózy. Nejvyššího efektu se docílilo podáním výtažku z listů (obr. č. 6) [31].

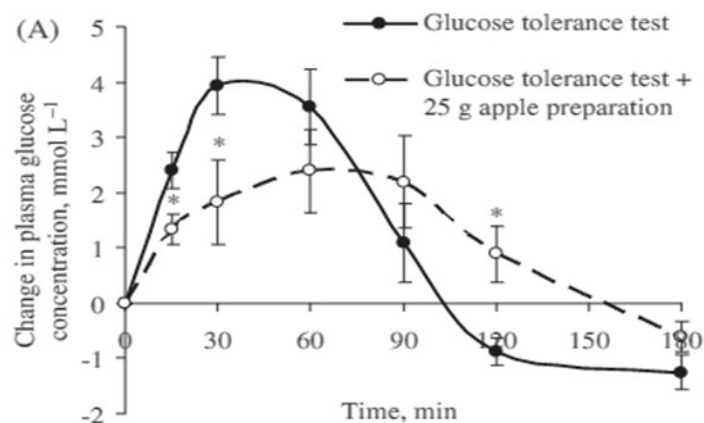


Obrázek č. 6: Vliv části jablka na postprandiální zvýšení glukózy. V prvním sloupci se nachází kontrola, druhý charakterizuje podání výtažků z listů, třetí z řapíku, čtvrtý ze slupky a pátý ze samotného plodu. Et = etanolový extrakt [31]

4.7.3. Antihyperglykemické účinky floridzinu u dobrovolníků

Cílem této studie bylo připravit jablečný prášek s vysokým množstvím vlákniny a floridzinu a sledovat efekt na snížení glukózy u šesti dobrovolníků – žen. Studie využila nezralá jablka z důvodu nižšího množství cukru. Účastníci byli vystaveni orálnímu glukózovému tolerančnímu testu (OGTT) a to s nebo bez přídavku jablečného prášku. Koncentrace floridzinu a jeho metabolitů byla měřena v plazmě a moči. Průměrná koncentrace glukózy dobrovolníků byla 5,7 mmol/l před OGTT. Po provedení OGTT se zvýšila koncentrace glukózy přibližně o 4 mmol/l, ale po provedení OGTT společně s jablečným práškem bylo zvýšení dvakrát nižší (obr. č. 7). Koncentrace glukózy v moči byla pětinasobně vyšší.

Získané výsledky naznačují, že prášek z nezralých jablek může být využit jako přírodní produkt snižující postprandiální glukózu a zlepšit zdraví pacientů s diabetem [49].



Obrázek č. 7: Efekt jablečného prášku na metabolismus glukózy během OGTT [49]

4.7.4. Efekt floridzinu při léčbě poškození jater

Byla provedena studie zkoumající ochranný efekt floridzinu proti poškození jater vyvolané léčbou methotrexátem (MTX). MTX se používá pro léčbu a profylaxi zánětlivých onemocnění, autoimunitních onemocnění (revmatoidní artritida) či maligních tumorů. Studie byla provedena zatím jen na krysách, kterým byly podány dávky MTX a následně floridzinu (orálně). Na základě biochemických markerů a histopatologických zkoušek došlo ke snížení projevů poškození jater a podání floridzinu naznačuje zmírnění a časnou léčbu MTX-indukované hepatotoxicity u člověka [32].

4.7.5. Vliv jablek na složení lidského střeva

Velká část jablečných fenolických látek uniká absorpcí v tenkém střevě a společně s nestrávenými polysacharidy se dostává do tlustého střeva, kde interagují se střevní mikroflórou. Cílem jedné studie bylo zhodnotit účinek tří komerčně dostupných odrůd jablek - Renetta Canady, Golden Delicious a Pink Lady – na mikrobiální složení lidského střeva. Tyto odrůdy byly in-vitro stráveny a fermentovány použitím kolonového modelu s naočkovanou střevní mikroflórou od zdravých dárců. Složení střevní mikroflóry byla zjišťována sekvenováním a

fluorescenční in-situ hybridizaci. Závěrem bylo zjištěno, že celá jablka jsou schopna přínosně měnit složení střevní mikroflóry. Zvláště odrůda Renetta Canady zvyšovala počet bifidobakterií, konkrétně *Faecalibacterium prausnitzii*. Tato in-vitro studie může sloužit jako předloha ke klinickým studiím [50].

4.7.6. Další využití ve farmaceutickém průmyslu

Další studie poskytují základ pro možné využití ve farmaceutickém průmyslu. Tato studie ukazuje na floretin a jeho antimikrobní účinnost proti gram-pozitivním (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, MRSA) i gram-negativním bakteriím (*Salmonella typhimurium*). Naopak floridzin a floretin 3',5'-di-C-glukosid vykazují nižší aktivitu proti *S. aureus* a neprokázaly aktivitu proti jiným testovaným kmenům (tab. č. 3) [33].

Tabulka č. 3: MIC testovaných dehydrochalkonů. Hodnoty jsou vyjádřeny v µg/ml a reprezentují průměr tří stanovení

	Floretin	Floridzin	Floretin 3',5'-di-C-glukosid
<i>S. aureus</i>	7.81	500	500
<i>L. monocytogenes</i>	62.5	>1000	>1000
<i>S. typhimurium</i>	125	>1000	>1000

4.8. Extrakce fenolických látek

Extrakcí se rozumí proces, jehož cílem je oddělit analyt od ostatních složek. Během separace jsou v kontaktu dvě nemísitelné fáze. Analyty se následně rozdělují mezi tyto fáze na základě rozdílné rozpustnosti. Extrakce bioaktivních sloučenin z rostlinného materiálu je prvním krokem k analýze těchto sloučenin, k jejich využití při přípravě doplňků stravy, potravinových přísad a k výrobě farmaceutických a kosmetických produktů.

Fenolické sloučeniny mohou být extrahovány čerstvé, zmražené nebo za sucha. Před extrakcí jsou rostlinné materiály upraveny mletím, sekáním. K sušení může dojít na čerstvém vzduchu nebo pomocí lyofilizace. Například jedna studie zkoumala účinky těchto dvou typu sušení na obsah fenolických sloučenin v ostružinách a jahodách. Výsledky ukázaly, že lyofilizace zachovává více těchto sloučenin [43].

Extrakce závisí na typu rozpouštědla, teplotě a na chemickém složení vzorku. Rostlinné materiály mohou obsahovat různé fenolické sloučeniny v různé kvantitě. Navíc tyto fenolické sloučeniny mohou být spojené s částmi rostlinných komponent jako sacharidy a proteiny. Proto neexistuje univerzální extrakce vhodná pro všechny rostlinné fenolické sloučeniny. K běžným rozpouštědlům patří metanol, etanol, aceton, etylacetát a v menší míře taky propanol, dimethylformamid. Rozlišujeme několik typů extrakce, například:

- Extrakce ultrazvukem (ultrasound-assisted extraction UAE) - při tomto typu extrakce působí ultrazvukové vlny na membrány a buněčné stěny za vzniku bublinek páry uvnitř a vně buňky. Tak dojde k rozrušení membrán, a tak selepší transport rozpouštědla dovnitř buňky a transport extrahované látky ven. Extrakce probíhá asi 30 minut. Po skončení je extrakt od zbytků tuhého vzorku oddělen filtrací nebo centrifugací. Využívá se k extrakci fenolických sloučenin z listů, stopek, plodů, semenek.
- Zrychlená extrakce rozpouštědlem (accelerated solvent extraction ASE) – jedná se o extrakci fenolických látek pod vysokou teplotou a tlakem. Je to rychlá metoda (15-12 minut). Pevný vzorek se umísťuje do nerezové patrony, kde je vzorek extrahován organickým rozpouštědlem a je zahříván při 80-200 °C a tlaku 10-20 MPa. Pomocí stlačeného dusíku je extrakt vytlačen do sběrné nádoby
- Extrakce podporována mikrovlnným ohřevem (microwave assisted solvent extraction, MASE) – při této extrakci se používají mikrovlny k ohřevu rozpouštědla nebo složek matrice. Použití této extrakce je možné jen u termostabilních látek.

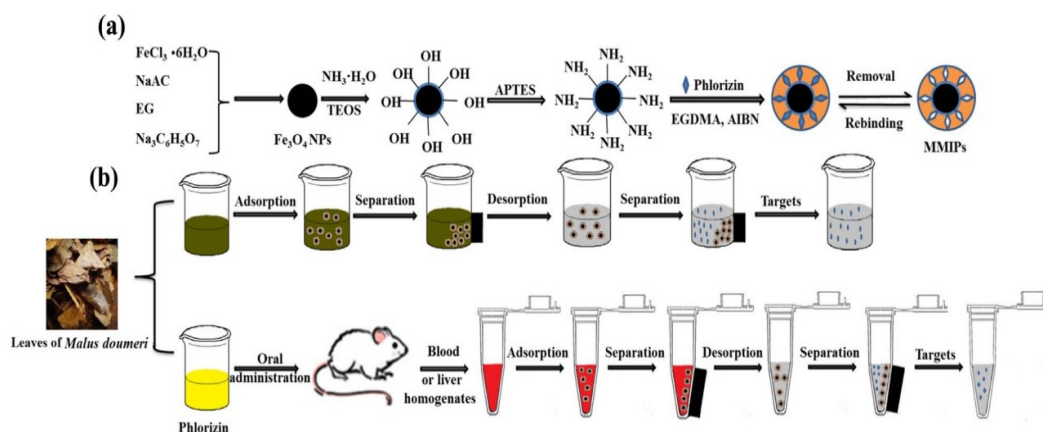
Rostlinné materiály mohou také obsahovat ne-fenolické sloučeniny jako cukry, organické kyseliny, tuky. Těchto látek se lze zbavit například pomocí extrakce na pevné fázi (SPE). K této extrakci dochází na pevné fázi ve formě sloupce sorbentu nebo membrány. Skládá se z těchto kroků: kondicionace (promytí rozpouštědlem, tím je aktivována pevná fáze, aby nedošlo ke vzájemnému působení se vzorkem), nanesení vzorku, vymytí balastních látek a nakonec eluce analytů. Eluát je zachytáván a podroben analýze [44, 45].

4.8.1. Magnetické molekulárně vtištěné polymery (MMIPs)

MIP jsou připravovány technologií molekulárního vtiskování. Používají se k selektivní separaci – vybraný analyt je zadržován na základě molekulárního tvaru, uspořádání a velikosti funkčních skupin.

Týmem vědců byl připraven MMIP pro specifickou retenci a selektivní extrakci floridzinu z listů *Malus doumeri*. Byla použita core-shell struktura s použitím Fe_3O_4 (vnitřní jádro) a mezoporézní polymer (vnější povrch) a floridzin sloužil jako templát. Takto vzniklý polymer byl aplikován jako sorbent pro extrakci magnetickou tuhou fází (MSPE) spojenou s HPLC. Principem MSPE je adsorpce analytu (floridzinu) z matrice na magnetické částice a následně odstranění pomocí vnějšího magnetického pole. Schématické znázornění přípravy a extrakce pomocí MMIP je znázorněna na obrázku č. 8.

Byla prokázána vyšší absorpční schopnost, vyšší selektivita u MMIP v porovnání s MNIP (magnetic non-molecularly imprinted polymers). Rovněž byla provedena validace metody stanovení floridzinu z extraktu listů s těmito výsledky: korelační koeficient floridzinu $r = 0,9991$; přesnost $\text{RSD} = 0,89 \%$, opakovatelnost $= 3,23 \%$; $\text{LOD} = 0,06 \mu\text{g/mL}$; $\text{LOQ} = 3,23 \mu\text{g/mL}$ a výtěžnost byla $81.45 \% - 90.27 \%$ [47].



Obrázek č. 8: Schématické znázornění (a) přípravy MMIPs, (b) extrakce floridzinu z listů a plazmy [47]

4.8.2. Kvantifikace fenolických látek z rostlinné matrice

Pro kvantifikaci fenolických látek z rostlin lze využít spektrofotometrické metody. Nejpoužívanější metodou je stanovení s činidlem Folin-Denis. Tato metoda se používá pro rutinní analýzu velkého počtu vzorků a je založena na redukční reakci fenolických látek s Folin-Denisovým činidlem (fosfomolybden – fosforečná kyselina), při které vznikají v zásaditém prostředí modře zabarvené komplexy. Folin-Ciocalteuova metoda je podobná předchozí metodě. Jako činidlo se využívá roztok wolframových a molybdenových oxidů a reakcí s fenolickými sloučeninami vznikají modře zabarvené komplexy. Obě dvě metody nejsou specifické a detekují všechny fenolické látky v extraktech, včetně těch, které jsou vázány na proteiny. Další nevýhodou je interference s kyselinou citrónovou [45, 46].

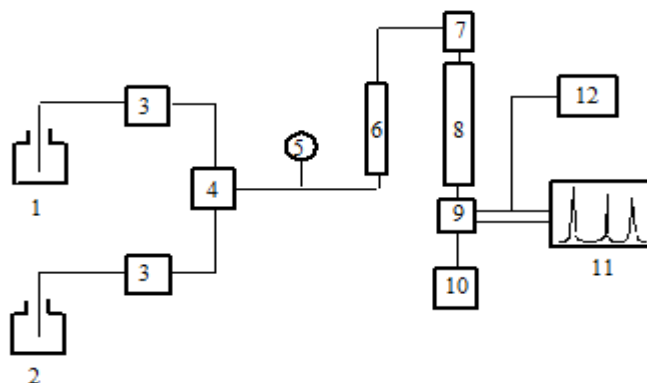
Pro separaci a kvantifikaci fenolických sloučenin se široce používá plynová chromatografie a zejména vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Pro objasnění struktury se navíc využívá hmotnostní spektrometrie.

4.9. Princip chromatografie

Jedná se o separační metodu, jejíž principem je mnohonásobné ustalování rovnováhy mezi mobilní fází a stacionární fází. Během chromatografie se separuje směs na jednotlivé složky. Jako mobilní (pohyblivá) fáze se používá plyn nebo kapalina. Jako stacionární (nepohyblivá) fáze se využívá tuhá nebo kapalná látka, nejčastěji silikagel, oxid hlinitý, celulóza. Tyto fáze musí být nemísitelné. Směs se umísťuje na začátek stacionární fáze a složky směsi jsou pak unášeny mobilní fází a při následných interakcích se stacionární fází jsou rozdílně zpomalovány a dochází k separaci.

4.9.1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

4.9.1.1. Blokové schéma a popis



Obrázek č. 9: Schéma HPLC systému [34]

Během separace je mobilní fáze vedena ze zásobníku mobilní fáze (1, 2). V zásobníku se nachází filtry, které slouží k zachycení prachových nečistot. Musí být dobře uzavřeny. Mobilní fáze je odplyňována pomocí degasseru, aby nedocházelo k tvorbě bublin. Mobilní fáze se ze zásobníku přivádí do vysokotlakého čerpadla (3). Mísení složek mobilní fáze umožňuje směšovač (4). Manometr (5) slouží pro kontrolu tlaku protékající mobilní fáze. Následuje dávkovač vzorku (6). Používají se manuální nebo automatické dávkovače. Mobilní fáze je dále vedena do předkolony (7), která slouží k ochraně kolony před zbytky matrice vzorku. K separaci dochází v koloně (8) a ta je spojena s detektorem (9), za kterým může být zařazen sběrač frakcí (10). Z detektoru jde signál do datové stanice (11). Rozlišujeme detektory spektrofotometrické, fluorescenční, elektrochemické, refraktometrické, vodivostní, chemiluminiscenční, univerzální, hmotnostně spektrometrické.

Detektory lze dělit na destrukční a nedestrukční. V těch nedestrukčních nedochází k chemické změně analytu. Mezi základní pojmy spojené s detekcí patří šum a drift. Šum zahrnuje všechny nepravidelné změny signálu detektoru. Je způsoben například teplotními změnami. Významně limituje citlivost detektoru. Drift poukazuje na dlouhodobou nestabilitu základní linie. Je spojen se změnou teploty detektoru [35].

4.9.2. Spektrofotometrické detektory

Tyto detektory měří absorbanci eluátu v oblasti vlnových délek od 190 – 800 nm. Velikost odezvy je dána Lambert-Beerovým zákonem – ten vyjadřuje vztah mezi tloušťkou absorbující vrstvy, koncentrací absorbující složky a vlastní velikost absorpce, vyjádřenou jako absorbance. Tímto detektorem lze identifikovat velký počet látek a jsou kompatibilní s gradientovou elucí. Požadavkem je nízká absorbance mobilní fáze při použité vlnové délce detekce (možný drift základní linie). Rozlišujeme:

- UV/VIS detektory s fixní vlnovou délkou
- UV/VIS detektory s nastavitelnou vlnovou délkou
- UV/VIS detektory s diodovým polem (PDA – photodiode-array, DAD – diode-array detector) – zaznamenávají celé spektrum v reálném čase bez přerušení chromatografické separace. Výsledkem je 3D spektrum a slouží k ověření čistoty píku [35].

4.9.3. Elektrochemické detektory

Tento typ detektoru je používán pro detekci látek, které jsou schopné elektrochemické reakce probíhající na fázovém rozhraní elektroda – mobilní fáze. Detektory měří určitou elektrickou veličinu (proud, náboj) vyvolanou průchodem látky celou detektorem, ve kterém se nachází elektrody s vloženým pracovním napětím nezbytným k průběhu elektrochemické reakce. Měřený elektrický signál je úměrný látkovému množství detekované složky. U těchto detektorů se sleduje závislost mezi elektrickou veličinou a koncentrací sledované látky. Rozlišujeme detektory amperometrické (měří proud), coulometrické.

Coulometrické detektory měří náboj potřebný k oxidaci nebo redukci celkového množství látky při průtoku měrnou celou. Účinnost elektrochemické reakce je možné zvýšit využitím tzv. elektrody fritového typu, u které mobilní fáze protéká porézní grafitovou pracovní elektrodou.

4.9.4. CoulArray detektor

Zapojením čtyř až šestnácti elektrod se získá tzn. CoulArray. Ve srovnání s jinými detektory je CoulArray selektivnější a citlivější. Odezva detektoru není příliš ovlivňována přítomností interferujících látek, a tak odpadá zdlouhavá a náročná úprava vzorku. CoulArray detektory nabízí možnost vysoce selektivní

analýzy fenolických sloučenin. Jako jediné z elektrochemických detektorů umožňují použití gradientové eluce. U jednoduchého detektoru se změny mobilní fáze projeví jako strmý drift základní linie. U CoulArray detektorů je tento drift pomocí softwaru vyrovnán a integrita píku je zachována [36].

Požadavky jsou kladeny na mobilní fázi. Musí být vodivá – s tím je spojena nutnost použití systému reverzních fází. Dále musí být čistá a dokonale odplyněna, protože přítomnost kyslíku a kovů je příčinou zvýšení pozadí, a tedy i šum a drift základní linie [34].

CoulArray detektory mají široké spektrum využití v potravinové analýze. Příkladem je analýza fenolických látek v medovině, respektive porovnání obsahu fenolických látek v přírodní medovině versus v medovině s přídavkem ovocných šťáv, koření, bylin [37], analýza fenolických látek v olivovém oleji [38]. Lze uvést i studii zaměřenou na analýzu celkem 32 přírodních antioxidantů v nápojích (pivo, víno, čaj, rostlinné extrakty) [39].

4.9.5. Základní chromatografické veličiny

Grafickým výstupem separačního procesu je chromatogram. Na ose x se nachází retenční čas a na ose y odezva detektoru (absorbance). Z chromatogramu lze vyčíst kvalitativní i kvantitativní údaje.

Retenční čas (t_R) slouží jako kvalitativní parametr, který představuje dobu od okamžiku nástřiku do doby maximální odezvy detektoru. Retenční objem (V_R) představuje objem mobilní fáze, který proteče kolonou od nástřiku vzorku do dosažení maximální odezvy detektoru.

Mezi další parametry patří mrtvý retenční čas (t_M) a mrtvý retenční objem (V_M). Tyto parametry udávají retenční čas či objem složky, která není na koloně zadržována a pohybuje se stejnou rychlostí jako mobilní fáze.

Kapacitní faktor (k') vyjadřuje míru separace od mrtvého retenčního času. Popisuje retenci určité látky na analytické koloně. Čím vyšší je hodnota, tím víc je látka na koloně zadržována.

Mezi kvantitativní údaje patří plocha pod píkem (A) analytu a výška píku. Hodnocení zahrnuje i tvar a symetrii píku (faktor symetrie A_s). Ideální pík má tvar Gaussovské křivky. Míru separace jednotlivých látek udává rozlišení (R_s) [34].

4.10. Validace chromatografické metody

Validací se rozumí proces, při kterém se určuje vhodnost daného systému pro získání relevantních dat. Prokazuje, že použitý postup je vhodný pro zamýšlené využití. Validací si laboratoř zajišťuje kvalitu dat. Používání validovaných metod je vyžadováno akreditací (formální potvrzení odborné způsobilosti laboratoře) [51, 52].

4.10.1. Kdy se provádí validace

- před zavedením nové metody
- před zavedením nového měřicího systému do laboratoře
- pokud kontrola kvality ukazuje přetrvávající problém
- pokud se rozšíří použití stávající metody o další účel
- při převzetí metody z jiné laboratoře nebo z publikace
- při významné změně instrumentace [51]

4.10.2. Validační parametry

A. Přesnost (precision)

Těsnost shody mezi vzájemně nezávislými výsledky za předem specifikovaných podmínek. Vyjadřuje (počítá) se jako směrodatná odchylka výsledků zkoušek

B. Opakovatelnost (repeatability)

Těsnost shody mezi vzájemně nezávislými výsledky získanými za podmínek opakovatelnosti (získají se opakovaným použitím dané metody na stejném materiálu, ve stejné laboratoři, stejným pracovníkem za použití týchž přístrojů).

C. Správnost (accuracy)

Těsnost získané hodnoty s referenční hodnotou. Vyjadřuje se jako výtěžnost (recovery). Hodnota výtěžnosti se získá přidáním měřeného analytu ke vzorku měřeného materiálu. Výtěžnost informuje o účinnosti izolace složky z matrice vzorku.

D. Linearita (linearity)

Přímková závislost mezi dvěma proměnnými, tj. odezvou instrumentace a koncentrací analytu (schopnost metody podávat výsledky přímo úměrné koncentraci analytu ve vzorku). Těsnost proměnných charakterizuje korelační koeficient (r), který nabývá hodnot -1 až $+1$. Čím víc se blíží hodnotě $+1$, tím vyšší je linearita stanovení [51, 53].

4.11. Příklady předchozích studií pro stanovení fenolických látek v *Malus* sp.

Tabulka č. 4: Přehled dřívějších studií a podmínky separací

Vzorek	Stanovované látky	Mobilní fáze	Detekce	Typ kolony	Zdroj
Jablečné listí	p-hydroxybenzoová kyselina, chlorogenová kyselina, quercetin-3-O-glukosid, isoquercitrin, rutin, floridzin	H ₂ O + H ₃ PO ₄ , ACN	PDA	Thermo Scientific Aquasil C18 (250 x 4,6 mm x 5 μm)	[18]
Jablko, hruška	Kyselina gallová, 5-hydroxymetylfurfural, prokyanidin B1, arbutin, p-hydroxybenzoová, katechin, chlorogenová kyselina, prokyanidin B2, kávová k., syringová k., epikatechin, p-kumarová k., ferulová k., sinapová k., floridzin, floretin, kvercetin, skořicová k.	H ₂ O + 2%CH ₃ COOH, H ₂ O + 0,5% CH ₃ COOH + ACN	MS	Aqua C18 (250 x 4,6 mm x 5 μm)	[40]
jablko	Prokyanidin B1, katechin, chlorogenová kyselina, Prokyanidin B2, Quercetin-3-O-glukosid, isoquercitrin, rutin, quercitrin, avikularin, phloridzin	H ₂ O + 2% CH ₃ COOH, ACN	PDA	YMC-Pack ODS-A C18 (250 x 4,6 mm x 5 μm) Předkolona: YMC-Triart C18 (10 x 3 mm, 5 μm)	[41]
Jablko	Chlorogenová k., ferulová k., p-kumarová k., kávová k., skořicová k., quercetin, rutin, floridzin, floretin	H ₂ O + 1% CH ₃ COOH, MetOH	PDA	Luna C18 (250 x 4,6 mm x 5 μm)	[42]

Z tabulky je patrné, že pro detekci fenolických látek se hojně využívá PDA (DAD) detektor. Jako mobilní fáze se často využívá organická složka složená z acetonitrilu či metanolu a vodná složka je obohacena kyselinou octovou nebo kyselinou fosforečnou. Pro separaci fenolických látek jsou často využívány kolony se sorbentem C18. Používají se delší kolony z důvodu velkého počtu stanovovaných látek a pro získání vyšší separační účinnosti.

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1. Přístroje a podmínky separace

Tabulka č. 5: Chromatografický systém

Chromatografická souprava	Shimadzu LC-10		
Čerpadlo	LC-10AD VP		
Autosampler	SIL-HT A		
Dávkování	1 μ l		
Termostat kolony	CTO-10A VP		
Kolona	YMC Triart C18 100 x 4,6 mm x 5 μ m, 12nm YMC-Triart C18 ExRS 150 x 4,6 mm x 5 μ m, 8 nm		
Mobilní fáze	Acetonitril, ultračistá voda + 0,1% kyselina fosforečná (pH= 2,2)		
Gradient	Čas [min]	ACN (%)	H2O pH 2,2 (%)
	0,01	10	90
	10	50	50
	10,2	10	90
	12,5	10	90
	12,51	stop	stop
Teplota	30 °C		
Detektor	DAD detektor SPM-M10A VP		
Detekce	280, 327, 354 nm		
Vyhodnocení	Software LC solution		

5.2. Chemikálie

Acetonitril (HPLC Gradient Grade), Sigma-Aldrich

Metanol (HPLC Gradient Grade), Sigma-Aldrich

Kyselina fosforečná, Sigma-Aldrich

Kyselina mravenčí, Sigma Aldrich

Kyselina octová, Sigma Aldrich

Ultračistá voda

Standardy:

Floretin ≥ 99 %, Sigma-Aldrich

Floridzin dihydrát 99 %, Sigma-Aldrich

Kvercitrin ≥ 78 %, Sigma-Aldrich

Kyselina gallová 99 %, Sigma-Aldrich

Kyselina chlorogenová ≥ 95 %, Sigma-Aldrich

Rutin > 94 %, Sigma-Aldrich

5.3. Příprava roztoků

Veškeré vzorky, standardy a roztoky standardů byly uchovávány v lednici při teplotě 4°C.

5.3.1. Příprava roztoků standardů

Roztoky standardů kyseliny gallové, kvercetinu, rutinu, floridzinu, floretinu, kvercitrinu o koncentraci 0,5 mg/ml byly připraveny navážením 0,5 mg daného standardu a rozpuštěny v 1 ml ACN. Kyselina chlorogenová o koncentraci 2 mg/ml byla připravena navážením 2 mg daného standardu a rozpuštěn v 1 ml ACN. Epikatechin o koncentraci 1 mg/ml byl připraven navážením 1 mg standardu a rozpuštěn v 1 ml ACN.

5.3.2. Příprava zásobních roztoků pro kalibraci

Zásobní roztoky (kyselina chlorogenová, rutin, kvercetrin, floretin) o koncentraci 1000 mg/l byly připraveny navážením 4 mg daného standardu ve 4 ml metanolu. Zásobní roztok floridzinu o koncentraci 10 000 mg/l byl připraven navážením 40 mg standardu floridzinu ve 4 ml metanolu.

5.3.3. Příprava pracovních roztoků pro kalibraci

Pracovní roztoky pro kyselinu chlorogenovou, rutin, kvercitrin, floretin byly připraveny smícháním jednotlivých zásobních roztoků s metanolem v poměrech uvedených v tabulce č. 6:

Tabulka č. 6: Příprava roztoku pro kalibraci pro kyselinu chlorogenovou, rutin, kvercitrin, floretin

Koncentrace (mg/l)	Objem zásobního roztoku každého ze 4 standardů (μl)	Objem metanolu (μl)
250	250	0
200	200	200
150	150	400
100	100	600
50	50	800
20	20	920
2	2	992

Pracovní roztoky pro floridzin byly připraveny do insertů smícháním zásobního roztoku a metanolu v poměrech uvedených v tabulce č. 7:

Tabulka č. 7: Příprava pracovních roztoků pro kalibraci pro floridzin

Koncentrace (mg/l)	Objem zásobního roztoku (μl)	Objem metanolu (μl)
10000	250	0
8000	200	50
6000	150	100
4000	100	150
2000	50	200
1000	25	225
500	12,5	237,5
200	5	245

5.3.4. Příprava zásobního roztoku pro výtěžnost

Pro měření výtěžnosti byly využity zásobní roztoky standardů pro kalibraci (viz kapitola 5.3.2.). Zásobní roztok pro výtěžnost byl složen z 1000 μ l kyseliny chlorogenové, 1000 μ l floretinu, 1000 μ l kvercitrinu, 500 μ l rutinu a 2 ml floridzinu. Uvedené roztoky byly napipetovány do 10 ml odměrné baňky a po rysku doplněny metanolem s 0,1% kyselinou mravenčí.

5.3.5. Příprava pracovních roztoků pro výtěžnost

Do 6 ependorfeček bylo na analytických váhách naváženo 0,05 g vzorku (suché rozemleté listy). Ke vzorku bylo přidáno 2 ml zásobního roztoku pro výtěžnost (viz kapitola 5.3.4.). Následovala ultrazvuková lázeň po dobu 30 minut, centrifugace při 5000 rpm po dobu 15 minut a filtrace přes PTFE membránový filtr 0,22 μ m.

K měření výtěžnosti bylo nutno připravit 3 roztoky bez přídavků standardů. Ty byly připraveny navážením 0,05 g vzorku a přidáním 2 ml rozpouštědla (metanol + 0,1 kyselina mravenčí) bez přídavku standardů. Následoval stejný postup extrakce uvedený výše.

5.3.6. Příprava pracovních roztoků pro přesnost

Do 6 ependorfeček bylo naváženo 0,05 g vzorku. Ke vzorku bylo přidáno 2 ml rozpouštědla (metanol + 0,1% kyselina mravenčí). Následovala ultrazvuková lázeň po dobu 30 minut, centrifugace při 5000 rpm po dobu 15 minut a filtrace přes PTFE filtr 0,22 μ m.

5.3.7. Příprava pracovních roztoků pro test opakovatelnosti

Pro test opakovatelnosti byly použity pracovní roztoky pro kalibraci o různých koncentracích. Jejich příprava je znázorněna v kapitole 5.3.3. Koncentrace, objem zásobního roztoku a objem rozpouštědla je vyobrazen v následujících tabulkách:

Tabulka č. 8: Příprava pracovních roztoků pro kyselinu chlorogenovou, rutin, kvercitrin, floretin pro test opakovatelnosti

Koncentrace (mg/l)	Objem zásobního roztoku (μ l)	Objem rozpouštědlo (μ l)
20	920	20
100	100	600
250	250	0

Tabulka č. 9: Příprava pracovních roztoků pro floridzin pro test opakovatelnosti

Koncentrace (mg/l)	Objem zásobního roztoku (μl)	Objem rozpouštědla (μl)
1000	25	225
4000	100	150
8000	200	50

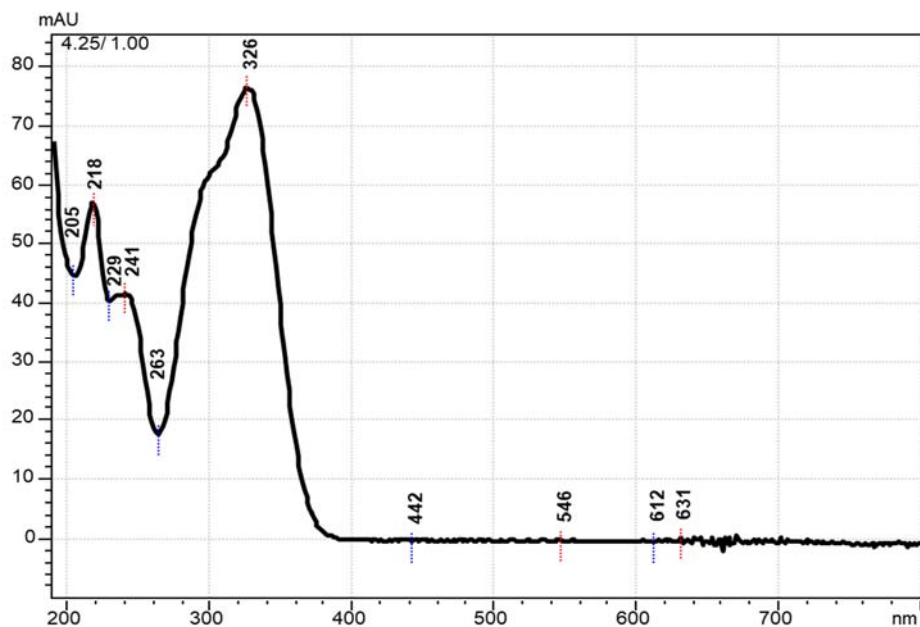
5.4. Postup extrakce fenolických sloučenin ze vzorků listí (kůry, pupenů)

1. Listí bylo nutné nejprve důkladně usušit.
2. Následně bylo listí rozmixováno a homogenizováno ve třecí misce.
3. Po homogenizaci se na analytických váhách odvážilo potřebné množství (0,05 g) a vzorek se umístil do 2ml centrifugační ependorfky.
4. Následovala extrakce metanolem s přidavkem 0,1% mravenčí kyseliny nebo 0,1% octové kyseliny (2 ml).
5. Po extrakci následovala ultrazvuková lázeň po dobu 30ti minut.
6. Dalším krokem byla centrifugace po dobu 15ti minut při 5000 rpm.
7. Poslední částí byla filtrace přes 0,22 μm stříkačkový filtr do vialky.
8. Kůra a pupeny byly odebrány sloupnutím z čerstvě odebraných jednoletých letorostů a poté důkladně vysušeny při pokojové teplotě.

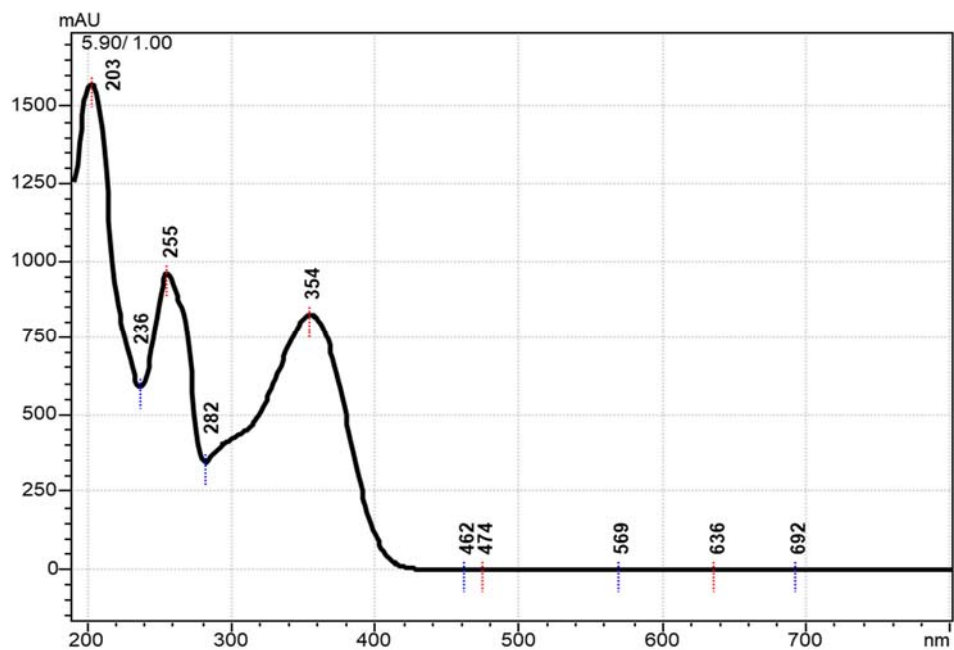
6. VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1. Volba vlnové délky

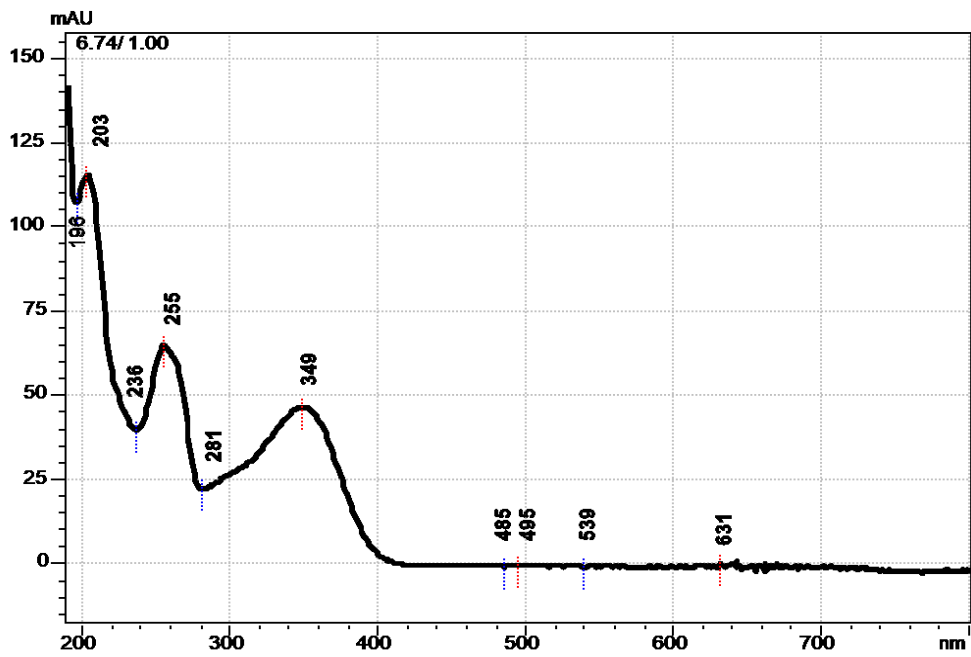
Detekce byla provedena při třech vlnových délkách 280, 327 a 354 nm v závislosti na absorpčním maximu jednotlivých fenolických sloučenin. Získaná absorpční spektra jsou následující:



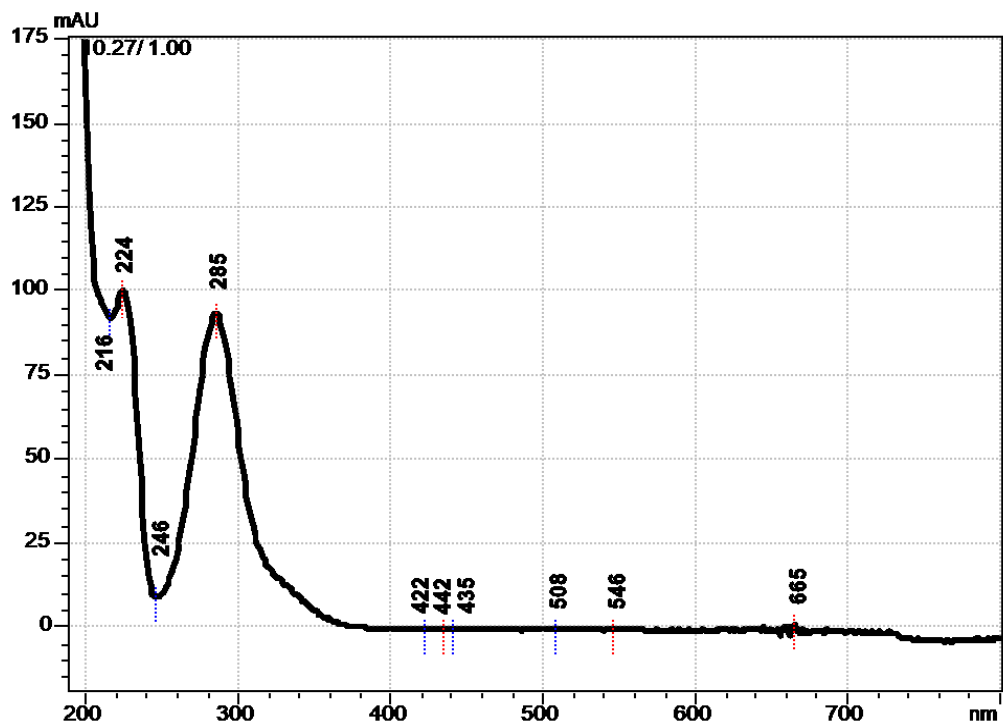
Obrázek č. 10: Absorpční spektrum kyseliny chlorogenové



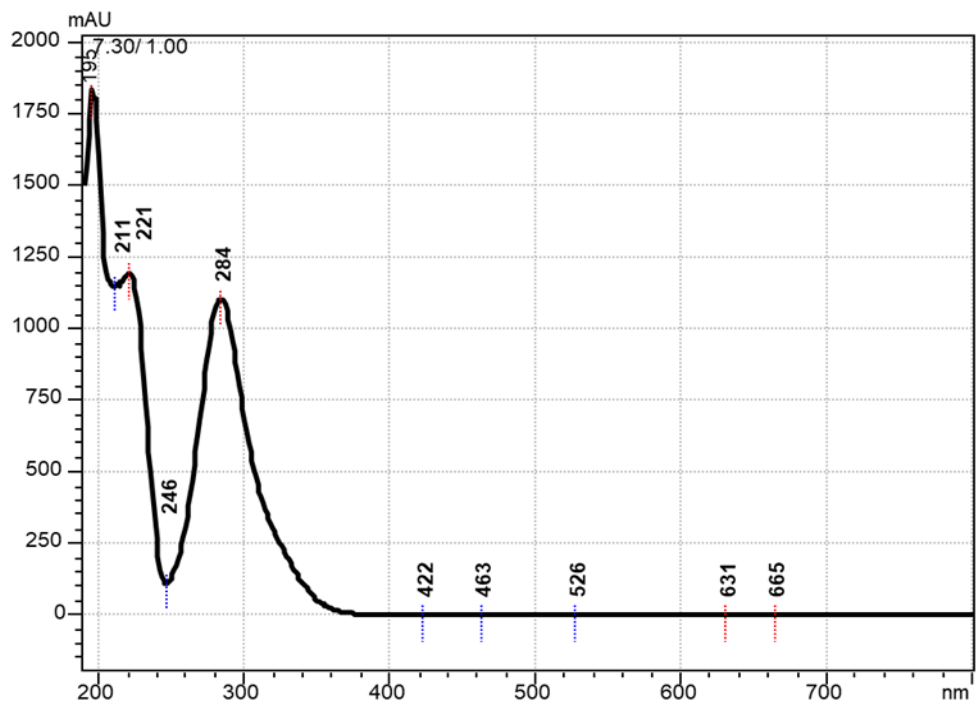
Obrázek č. 11: Absorpční spektrum rutinu



Obrázek č. 12: Absorpční spektrum kvercitrinu



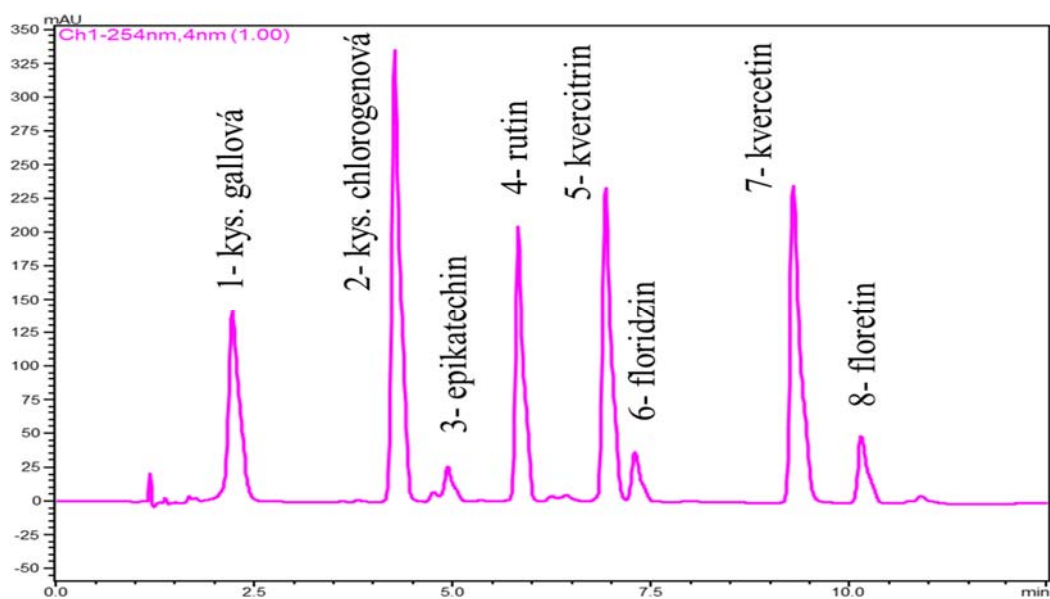
Obrázek č. 13: Absorpční spektrum floretinu



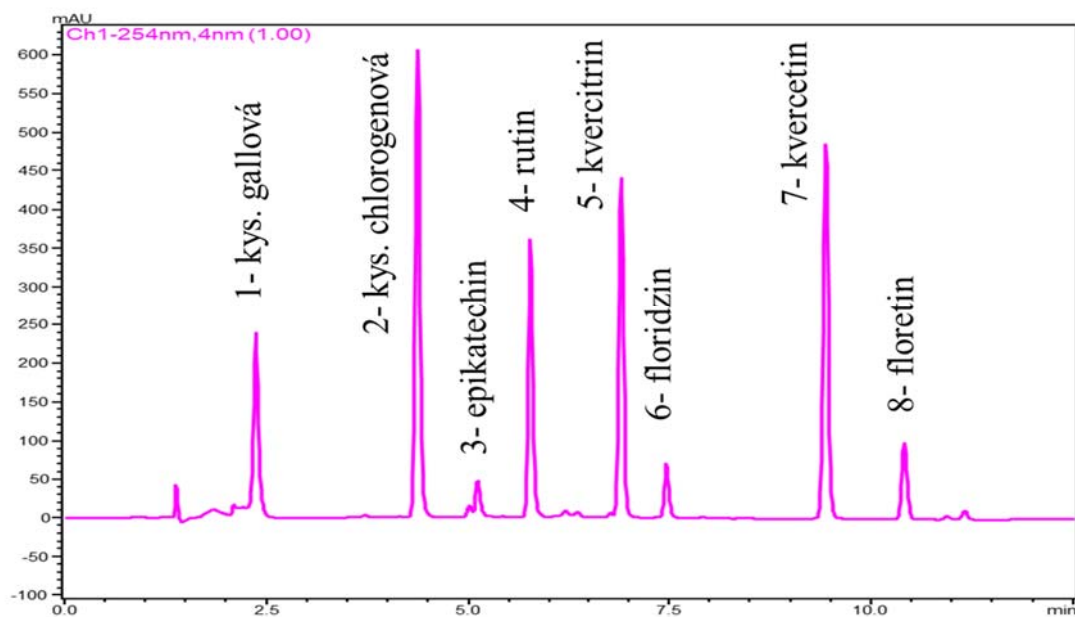
Obrázek č. 14: Absorpční spektrum flordizinu

6.2. Volba kolony

Byly zkoušeny dvě kolony: YMC Triart C18 100 x 4,6 mm x 5 μ m, 12nm, jejíž separační účinnost pro analýzu fenolických látek je vyobrazen na obrázku č. 15 a YMC-Triart C18 ExRS 150 x 4,6 mm x 5 μ m, 8 nm (obr. č. 16). Mezi hodnotící parametry patřila symetrie píků, dostatečné rozlišení jednotlivých látek a celkový čas separace. Z důvodu lepší separační účinnosti, která je způsobena pravděpodobně větším obsahem uhlíku v ExRS fázi (25%) a větším množstvím stacionární fáze v koloně, byla vybrána kolona.



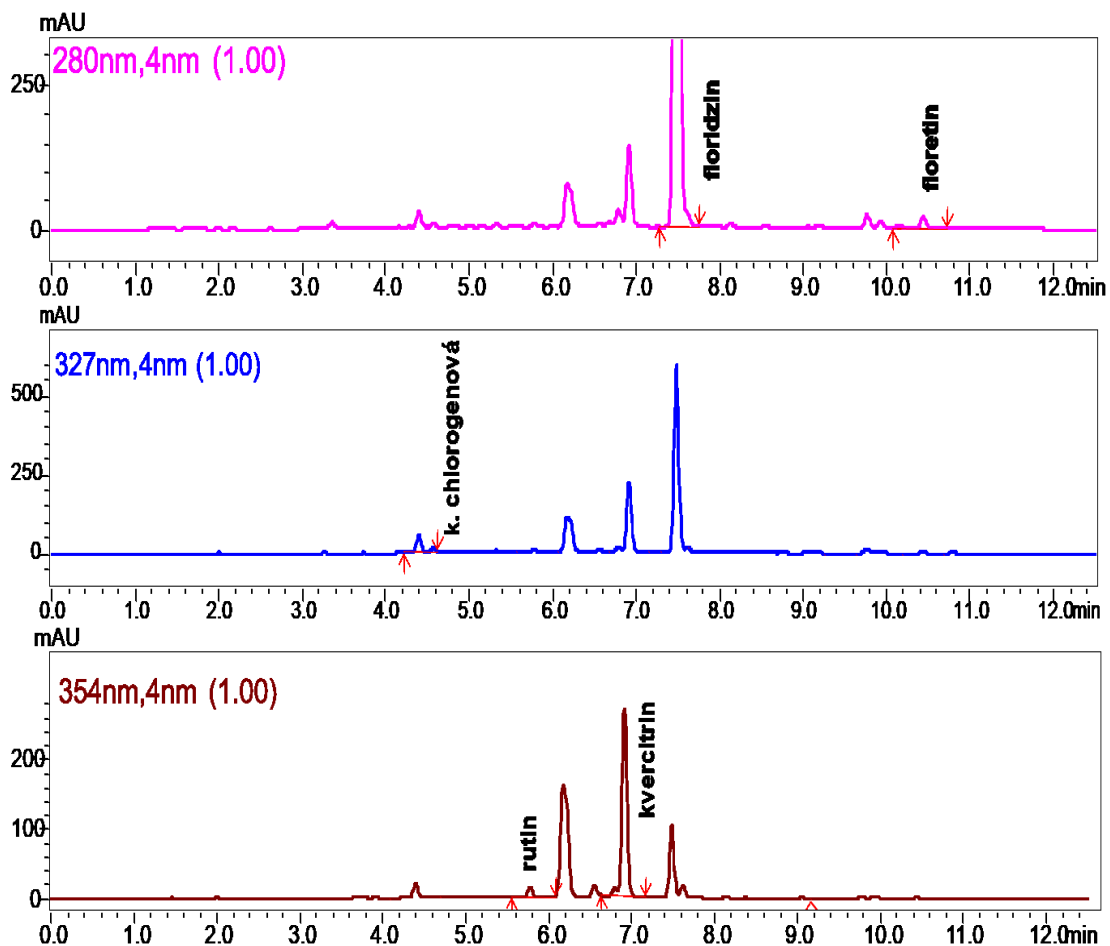
Obrázek č. 15: Separace na koloně YMC Triart C18 100 x 4,6 mm x 5 μ m, 12nm



Obrázek č. 16: Separace na koloně YMC-Triart C18 ExRS 150 x 4,6 mm x 5 μ m, 8 nm

6.3. Identifikace jednotlivých fenolických látek

Identifikace jednotlivých fenolických látek byla provedena porovnáním retenčních časů látek z extraktů vzorků listů a retenčních časů jednotlivých standardů. Separační podmínky jsou vyobrazeny v tabulce č. 5. Chromatogramy s jednotlivými analyty jsou vyobrazeny na obrázku č. 17:



Obrázek č. 17: Chromatogramy reálného vzorku listů jabloně

6.4. Validace analytické metody

6.4.1. Test vhodnosti chromatografického systému

K hodnocení se využil pracovní roztok pro kalibraci o koncentraci 50 mg/l (viz kapitola 5.3.3.).

Pro stanovení vhodnosti chromatografického systému se hodnotil retenční čas (t_R), rozlišení chromatografických píků (R_s), píková kapacita (P) a faktor symetrie (A_s). Hodnotí se ze tří nástřiků.

Píková kapacita se vypočítá dle následujícího vzorce:

$$P_c = 1 + \frac{t_g}{w_b}$$

t_g ...doba trvání gradient

w_b ...šířka píku při základně

Tabulka č. 10: Parametry testu vhodnosti chromatografického systému

Hodnocená látka	t_r [min]	R_s	P_c	A_s
Floridzin	7,479	4,506	26	1,289
Floretin	10,425	6,847	26	1,168
Kyselina chlorogenová	4,325	5,404	26	1,231
Rutin	5,779	11,390	34,3	1,224
Kvercitrin	6,915	8,923	29,6	1,195

Rozlišení chromatografických píků je v rozmezí 4,51 -11,39, tedy větší jak 1,5 a splňuje doporučený limit.

6.4.2. Linearita

Pro stanovení linearity byly použity kalibrační roztoky o koncentraci: 2, 20, 50, 100, 150, 200, 250 mg/l (viz kapitola 5.3.3). U každého roztoku byly provedeny 3 nástřiky. Ze získaných ploch píků se stanovila průměrná hodnota. Tato hodnota se využila k vyhodnocení závislosti na koncentraci látky metodou lineární regrese.

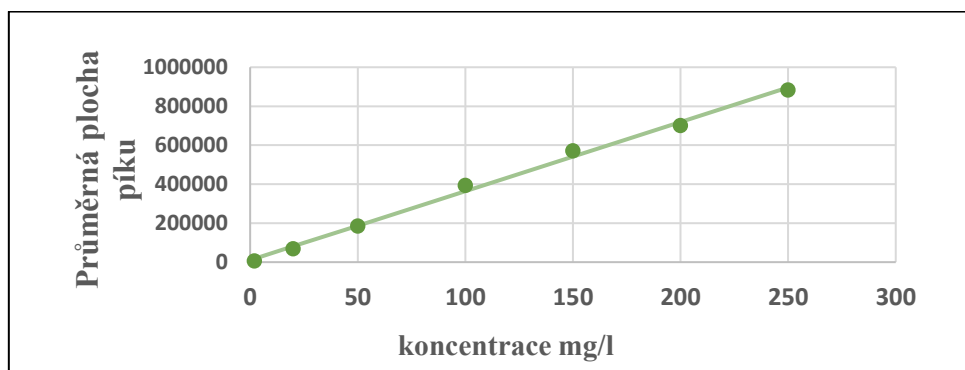
6.4.2.1. Kalibrační závislost pro floretin

Tabulka č. 11: Test linearity pro floretin

Koncentrace (mg/l)	Průměrná plocha píku
2	5564
20	68847
50	185004
100	392835
150	571531
200	700413
250	883785

Tabulka č. 12: Parametry lineární regrese pro floretin

Statistické parametry pro regresi: $y = kx + q$			
Počet bodů	n =	7	Odhad chyby ± 96,82 ± 13590,9
Směrnice	k =	3544	
Absolutní člen	q =	10273	
Korelační koeficient	r =	0,998139	
Reziduální odchylka	s =	22242	



Obrázek č. 18: Kalibrační závislost pro floretin

Korelační koeficient floretinu v koncentračním rozmezí 2 – 250 mg/l byl 0,99824.

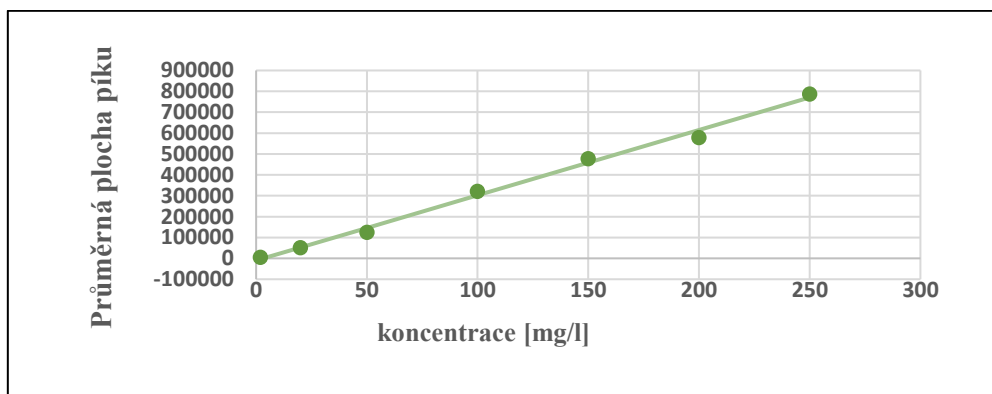
6.4.2.2. Kalibrační závislost pro kyselinu chlorogenovou

Tabulka č. 13: Test linearity pro kyselinu chlorogenovou

Koncentrace (mg/l)	Průměrná plocha píku
2	4711
20	51246
50	124509
100	320112
150	476033
200	578219
250	786503

Tabulka č. 14: Parametry pro lineární regresi kyseliny chlorogenové

Statistické parametry pro regresi: $y = k x + q$			
Počet bodů	n =	7	Odhad chyby ± 101,90 ± 14302,96
Směrnice	k =	3122	
Absolutní člen	q =	-9841,2	
Korelační koeficient	r =	0,997347	
Reziduální odchylka	s =	23407,39	



Obrázek č. 19: Kalibrační závislost pro kyselinu chlorogenovou

Korelační koeficient kyseliny chlorogenové v koncentračním rozmezí 2 – 250 mg/l byl 0,99735.

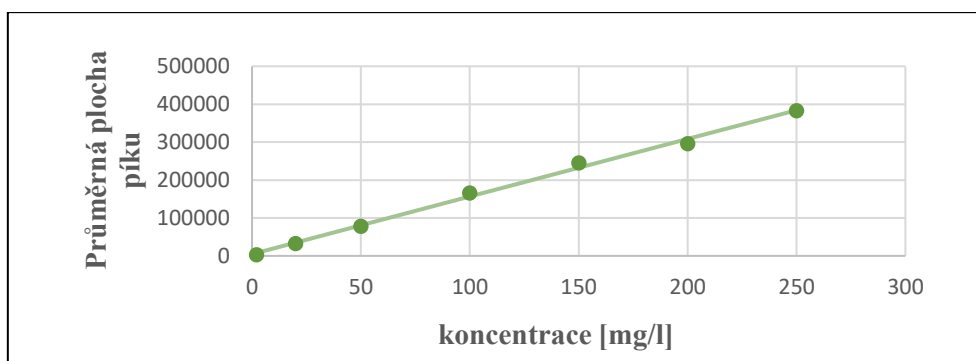
6.4.2.3. Kalibrační závislost pro rutin

Tabulka č. 15: Test linearity pro rutin

Koncentrace (mg/l)	Průměrná plocha píku
2	3081
20	32865
50	78201
100	166005
150	245368
200	295573
250	383276

Tabulka č. 16: Parametry pro lineární regresi rutinu

Statistické parametry pro regresi: $y = k x + q$			
Počet bodů	n =	7	Odhad chyby ± 41,46 ± 5819,63
Směrnice	k =	1517	
Absolutní člen	q =	4652,95	
Korelační koeficient	r =	0,99814	
Reziduální odchylka	s =	9524,07	



Obrázek č. 20: Kalibrační závislost pro rutin

Korelační koeficient rutinu v koncentračním rozmezí 2 – 250 mg/l byl 0,99814.

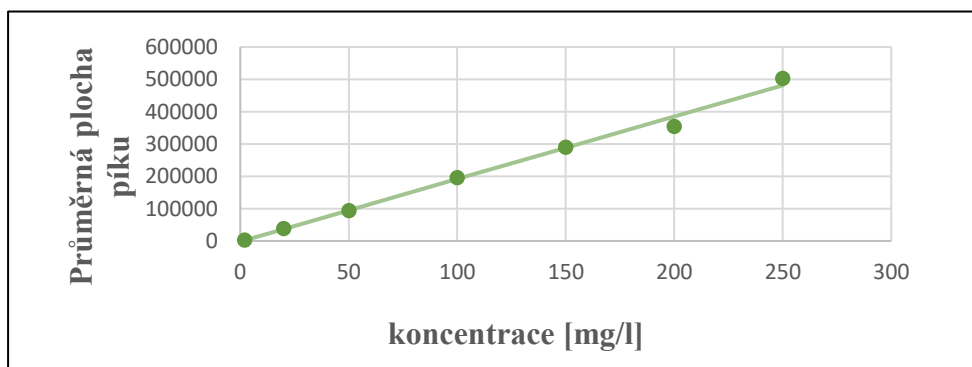
6.4.2.4. Kalibrační závislost pro kvercitrin

Tabulka č. 17: Test linearity pro kvercitrin

Koncentrace (mg/l)	Průměrná plocha píku
2	3129
20	38757
50	94138
100	195966
150	290259
200	353999
250	502717

Tabulka č. 18: Parametry pro lineární regresi kvercitrinu

Statistické parametry pro regresi: $y = k x + q$			
Počet bodů	n =	7	Odhad chyby ± 73,64 ± 10335,8
Směrnice	k =	1933	
Absolutní člen	q =	-1906,63	
Korelační koeficient	r =	0,996392	
Reziduální odchylka	s =	16914,97	



Obrázek č. 21: Kalibrační závislost kvercitrinu

Korelační koeficient kvercitrinu v koncentračním rozmezí 2 – 250 mg/l byl 0,99640.

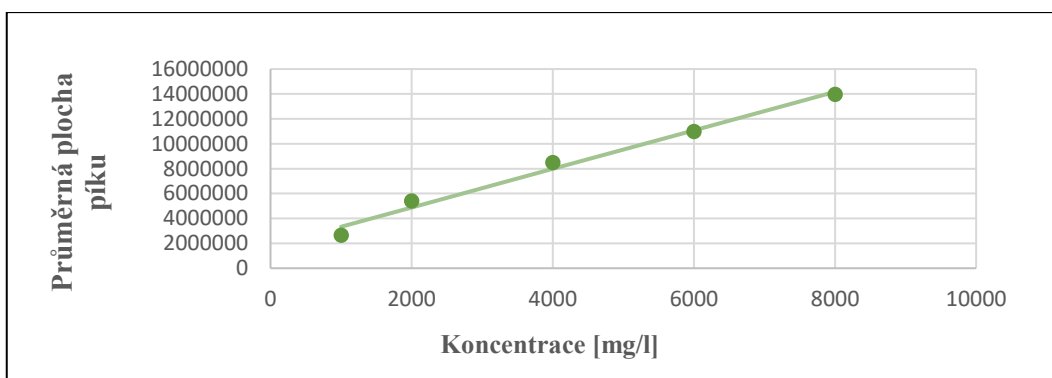
6.4.2.5. Kalibrační závislost pro floridzin

Tabulka č. 19: Kalibrační závislost pro floridzin

Koncentrace (mg/l)	Průměrná plocha píku
1000	2645978
2000	5382178
4000	8471877
6000	10977955
8000	13948566

Tabulka č. 20: Parametry pro lineární regresi floridzinu

Statistické parametry pro regresi: $y = k x + q$			
Počet bodů	n =	5	Odhad chyby ± 102,0967 ± 502249,2
Směrnice	k =	1547	
Absolutní člen	q =	1785225	
Korelační koeficient	r =	0,993535	
Reziduální odchylka	s =	584720,8	



Obrázek č. 22: Kalibrační závislost floridzinu

Korelační koeficient floridzinu v koncentračním rozmezí 1000 - 8000 mg/l byl 0,99354.

6.4.3. Opakovatelnost

Pro stanovení opakovatelnosti kyseliny chlorogenové, rutinu, kvercitrinu, floretinu byly použity kalibrační roztoky o koncentraci 20, 100, 250 mg/l (viz kapitola 5.3.3). Pro stanovení opakovatelnosti floridzinu byly použity kalibrační roztoky o 1000, 4000, 8000 mg/l. U každého roztoku bylo provedeno 7 nástrůků.

Tabulka č. 21: Opakovatelnost plochy píků pro floretin, rutin, kvercitrin, kyselinu chlorogenovou při koncentraci 20 mg/l a pro floridzin při koncentraci 1000 mg/l

Koncentrace 20 mg/l					1000 mg/l
Nástrůk	Floretin	Rutin	Kvercitrin	Kys. chlorogenová	Floridzin
1	70291	32969	39885	50983	2220843
2	69572	33031	39388	49104	2224649
3	69413	33282	39440	49312	2229491
4	70088	32928	39458	49464	2220711
5	69676	32960	39394	49259	2239718
6	70165	32969	39371	49112	2217568
7	69815	32774	38379	49096	2220566
Průměr	69860	32988	39331	49476	2224792
SD	329	152	456	678	7607
RSD [%]	0,47	0,46	1,16	1,37	0,34

RSD opakovatelnosti pro koncentraci 20 mg/l dosahovala hodnot od 0,46 do 1,37 % a pro floridzinu o koncentraci 1000 mg/l 0,34 %.

Tabulka č. 22: Opakovatelnost plochy píků pro floretin, rutin, kvercitrin, kyselinu chlorogenovou při koncentraci 100 mg/l a pro floridzin při koncentraci 4000 mg/l

Koncentrace 100 mg/l					4000 mg/l
Nástřík	Floretin	Rutin	Kvercitrin	Kyselina chlorogenová	Floridzin
1	407956	171190	206074	332315	8418640
2	414353	175001	206581	337612	8451717
3	408745	171567	203282	332422	8489361
4	410081	172409	205123	334378	8468842
5	405708	170161	201681	330523	8545679
6	406997	171166	202981	331659	8505491
7	408566	171179	202954	331294	8522342
Průměr	408915	171810	204097	332886	8486010
SD	2768	1555	1834	2406	43360
RSD [%]	0,68	0,91	0,90	0,72	0,51

RSD opakovatelnosti pro koncentraci 100 mg/l dosahovala hodnot od 0,68 do 0,91 % a pro floridzinu o koncentraci 4000 mg/l 0,51 %.

Tabulka č. 23: Opakovatelnost plochy píků pro floretin, rutin, kvercitrin, kyselinu chlorogenovou při koncentraci 250 mg/l a pro floridzin při koncentraci 8000 mg/l

Koncentrace 250 mg/l					8000 mg/l
Nástřík	Floretin	Rutin	Kvercitrin	Kyselina chlorogenová	Floridzin
1	977550	422783	556950	866776	14223057
2	966081	417828	548885	855800	14011397
3	970224	418464	550936	857951	14004569
4	963642	416351	553078	853864	14244279
5	928402	400593	527051	823273	14154536
6	962423	415704	546700	851963	14274415
7.	-	-	-	-	14140712
Průměr	961387	415287	547267	851605	14150424
SD	15575	6952	9597	13515	108145
RSD [%]	1,62	1,67	1,75	1,59	0,76

RSD opakovatelnosti pro koncentraci 250 mg/l dosahovala hodnot od 1,59 do 1,75 % a pro floridzinu o koncentraci 8000 mg/l 0,76 %.

6.4.4. Výtěžnost

K určení výtěžnosti bylo využito dohromady 9 roztoků. 6 roztoků extraktů z listů v metanolu s 0,1% kyselina mravenčí bylo připraveno s přidavkem standardů a zbytek roztoků bez přidavku standardů. Příprava je popsána v kapitole 5.3.5. U každého roztoku byly provedeny tři nástřiky. Z nástřiků byl získán průměr ploch, který se přepočítal na jednotnou navážku 0,05 g dle následujícího vzorce:

$$x = A * \frac{0,05}{m}$$

A...průměrná plocha píků

m...hmotnost navážky

Výtěžnost se vypočítala dle následujícího vzorce:

$$R_e = \frac{A_{VZ+ST} - A_{VZ}}{A_{ST}}$$

A_{VZ+ST}...plocha píků vzorku s přidavkem standardů

A_{VZ}...plocha píků vzorku

A_{ST}...plocha píků standardu

Tabulka č.24: Hodnoty pro výpočet výtěžnosti

	Floridzin	Floretin	Kys. chlorogenová	Rutin	Kvercitrin
Výtěžnost [%]	87,58	93,41	135,68	96,30	95,29
	80,72	88,31	126,88	96,78	78,99
	81,87	87,29	137,14	96,43	72,73
	86,69	87,70	122,87	95,79	72,00
	94,13	91,55	102,16	98,38	81,99
	101,47	94,37	114,54	99,84	118,24
Průměr	88,74	90,44	123,21	97,25	86,54
SD	7,85	3,08	13,28	1,55	17,67
RSD (%)	8,85	3,41	10,78	1,59	20,42

Průměrné hodnoty výtěžnosti se pohybovaly od 86,54 do 123,51 %. Hodnoty RSD byly od 1,59 do 20,42 %.

6.4.5. Přesnost

K určení přesnosti bylo využito šesti roztoků, jejichž příprava je popsána v kapitole 5.3.6. U každého roztoku byly provedeny tři nástřiky. Z nástřiku byl získán průměr ploch, který se přepočítal na jednotnou navážku 0,05 g dle následujícího vzorce:

$$x = A * \frac{0,05}{m}$$

A...průměrná plocha píků

m...hmotnost navážky

Tabulka č. 25: Hodnoty pro výpočet přesnosti

	Floridzin	Floretin	Chlorogenová kyselina	Rutin	Kvercitrin
Průměrné hodnoty ploch píků	10943246	178275	260835	39228	939382
	11054134	187048	254297	40766	900478
	10958131	188025	255554	41133	873411
	11538812	203375	269610	44052	924125
	10939780	190084	252338	43213	868453
	11073397	197138	259251	42327	880180
Průměr	11084583	190657	258648	41787	897672
SD	229917	8687	6223	1759	28968
RSD (%)	2,07	4,56	2,40	4,21	3,23

RSD stanovovaných látek se pohybovaly od 2,07 do 4,56 %.

6.5. Stanovení obsahu fenolických sloučenin v listech jabloní

Celkem bylo k analýze použito 9 vzorků listů, 5 vzorků kůry a 5 vzorků pupenů pocházejících z různých odrůd jabloní. Vzorky byly sesbírány v obci Roudnička (katastrální č. parcely 58/87) v období října 2017 (stáří stromů 3-8 let). K dispozici byly dostupné tyto odrůdy jabloní: Melrose, Melodie, Rubinola, Průsvitné letní, Fragrance, Goldstar, Topaz, Bohemia Gold, Gloster. Příprava těchto vzorků je vyobrazena v kapitole 5.4. Z každé odrůdy listů byly zhotoveny 2 extrakty – s přidávkem kyseliny mravenčí nebo kyseliny octové. Obsah fenolických látek v těchto extraktech se následně porovnával. Z každého vzorku byly provedeny dva nástřiky na kolonu, ze kterých byla stanovena průměrná hodnota plochy píku. Z průměrných hodnot ploch píků jednotlivých analytů a standardů byla vypočtena koncentrace jednotlivých fenolických látek v mg/l dle následujícího vzorce:

$$c_X = \frac{A_X}{A_{ST}} * c_{ST} * 10$$

A_X ...průměrná plocha píku analytu

A_{ST} ...průměrná plocha píku standardu

c_X ...koncentrace analytu

c_{ST} ...koncentrace standardu

Koncentrace standardu se vypočítá:

$$c_{ST} = C_{ZAS} * \text{zředění}$$

$$c_{ST} = C_{ZAS} * \frac{V_{\text{zásobních roztoků}}}{V_{\text{celkový}}}$$

C_{ZAS} ...koncentrace zásobního roztoku

Korekční faktor 10 souvisí s přepočtem na objem nástřiku vzorku a standardu.

V odborné literatuře se uvádí výsledná koncentrace analytů z listů v mg/g [18, 19, 20]. Nejprve se provedl přepočet obsahu na množství použitého rozpouštědla, tj. na 2 ml (2 ml metanolu s 0,1% kyselinou mravenčí nebo octovou). Výsledkem byla koncentrace v mg/ml. Ta byla dále přepočítána na hodnotu reálné náváčky vzorku a dále na mg/g s korekcí na čistotu daného standardu.

Získané hodnoty a výsledky pro jednotlivé vzorky jsou uvedeny v následujících tabulkách:

Tabulka č. 26: Stanovení a porovnání obsahu analytů z listí u odrůdy 'Melrose' při extrakci metanol + kyselina mravenčí a při extrakci metanol + kyselina octová

Melrose	Průměrná plocha píků (MeOH/mrav.)	Průměrná plocha píků (MeOH/oct.)	Koncentrace látky v (mg/g) sušeného listí	
			Extrakt (MeOH/mrav.)	Extrakt (MeOH/oct.)
Kyselina chlorogenová	292832	272817	0,95	0,89
Epikatechin	0	0	0	0
Rutin	20024	16361	0,10	0,07
Kvercitrin	287144	266943	1,04	0,97
Floridzin	11894077	11425099	47,60	45,72
Kvercetin	0	0	0	0
Floretin	164384	169718	0,37	0,38

Celkový obsah fenolických látek z listí u odrůdy 'Melrose' při extrakci metanol + kyselina mravenčí činí 50,06 mg/g a metanol + kyselina mravenčí činí 48,04 mg/g

Tabulka č. 27: Stanovení a porovnání obsahu analytů z listí u odrůdy 'Melodie' při extrakci metanol + kyselina mravenčí a při extrakci metanol + kyselina octová

Melodie	Průměrná plocha píků (MeOH/mrav.)	Průměrná plocha píků (MeOH/oct.)	Koncentrace látky v (mg/g) sušeného listí	
			Extrakt (MeOH/mrav.)	Extrakt (MeOH/oct.)
Kyselina chlorogenová	383439	280923	1,25	0,92
Epikatechin	0	0	0	0
Rutin	22929	13164	0,10	0,06
Kvercitrin	1536612	1045490	5,56	3,78
Floridzin	16230328	14761169	64,96	59,08
Kvercetin	0	0	0	0
Floretin	172363	135560	0,39	0,31

Celkový obsah fenolických látek z listí u odrůdy 'Melodie' při extrakci metanol + kyselina mravenčí činí 72,25 mg/g a metanol + kyselina octová činí 64,14 mg/g

Tabulka č. 28: Stanovení a porovnání obsahu analytů z listů u odrůdy 'Rubinola' při extrakci metanol + kyselina mravenčí a při extrakci metanol + kyselina octová

Rubinola	Průměrná plocha píků (MeOH/mrav.)	Průměrná plocha píků (MeOH/oct.)	Koncentrace látky v (mg/g) sušeného listí	
			Extrakt (MeOH/mrav.)	Extrakt (MeOH/oct.)
Kyselina chlorogenová	328153	317294	1,07	1,03
Epikatechin	0	0	0	0
Rutin	67614	68813	0,31	0,31
Kvercitrin	1053746	1006919	3,81	3,64
Floridzin	10678915	10517814	42,74	42,09
Kvercetin	0	0	0	0
Floretin	98907	102155	0,22	0,23

Celkový obsah fenolických látek z listů u odrůdy 'Rubinola' při extrakci metanol + kyselina mravenčí činí 48,15 mg/g a metanol + kyselina octová činí 47,31 mg/g

Tabulka č 29: Stanovení a porovnání obsahu analytů z listů u odrůdy 'Průsvitné letní' při extrakci metanol + kyselina mravenčí a při extrakci metanol + kyselina octová

Průsvitné letní	Průměrná plocha píků (MeOH/mrav.)	Průměrná plocha píků (MeOH/oct.)	Koncentrace látky v (mg/g) sušeného listí	
			Extrakt (MeOH/mrav.)	Extrakt (MeOH/oct.)
Kyselina chlorogenová	493577	422294	0,40	1,38
Epikatechin	0	0	0	0
Rutin	21819	16941	0,10	0,08
Kvercitrin	988850	811287	3,58	0
Floridzin	13280706	12837105	53,15	51,38
Kvercetin	0	0	0	2,93
Floretin	127736	122056	1,15	0,28

Celkový obsah fenolických látek z listů u odrůdy 'P. letní' při extrakci metanol + kyselina mravenčí činí 58,37 mg/g a metanol + kyselina octová činí 56,04 mg/g

Tabulka č. 30: Stanovení a porovnání obsahu analytů z listí u odrůdy 'Fragrance' při extrakci metanol + kyselina mravenčí a při extrakci metanol + kyselina octová

Fragrance	Průměrná plocha píků (MeOH/mrav.)	Průměrná plocha píků (MeOH/oct.)	Koncentrace látky v (mg/g) sušeného listí	
			Extrakt (MeOH/mrav.)	Extrakt (MeOH/oct.)
Kyselina chlorogenová	212625	180349	0,69	0,59
Epikatechin	0	0	0	0
Rutin	28904	27063	0,13	0,12
Kvercitrin	788121	620049	2,85	2,24
Floridzin	12739960	10813507	50,99	43,28
Kvercetin	0	0	0	0
Floretin	97317	86717	0,22	0,20

Celkový obsah fenolických látek z listí u odrůdy 'Fragrance' při extrakci metanol + kyselina mravenčí činí 54,88 mg/g a metanol + kyselina octová činí 46,42 mg/g

Tabulka č. 31: Stanovení a porovnání obsahu analytů z listí u odrůdy 'Goldstar' při extrakci metanol + kyselina mravenčí a při extrakci metanol + kyselina octová

Goldstar	Průměrná plocha píků (MeOH/mrav.)	Průměrná plocha píků (MeOH/oct.)	Koncentrace látky v (mg/g) sušeného listí	
			Extrakt (MeOH/mrav.)	Extrakt (MeOH/oct.)
Kyselina chlorogenová	275580	235002	0,90	0,77
Epikatechin	0	0	0	0
Rutin	42346	44227	0,19	0,20
Kvercitrin	1152896	988627	4,17	3,57
Floridzin	10896184	9815386	43,61	39,28
Kvercetin	0	0	0	0
Floretin	106385	101091	0,24	0,23

Celkový obsah fenolických látek z listí u odrůdy 'Goldstar' při extrakci metanol + kyselina mravenčí činí 49,11 mg/g a metanol + kyselina octová činí 44,05 mg/g

Tabulka č. 32: Stanovení a porovnání obsahu analytů z listí u odrůdy 'Topaz' při extrakci metanol + kyselina mravenčí a při extrakci metanol + kyselina octová

Topaz	Průměrná plocha píků (MeOH/mrav.)	Průměrná plocha píků (MeOH/oct.)	Koncentrace látky v (mg/g) sušeného listí	
			Extrakt (MeOH/mrav.)	Extrakt (MeOH/oct.)
Kyselina chlorogenová	1425820	857916	4,65	2,80
Epikatechin	0	0	0	0
Rutin	24182	13610	0,11	0,06
Kvercitrin	1105464	709338	4,00	2,56
Floridzin	13087208	10467878	52,38	41,89
Kvercetin	0	0	0	0
Floretin	22762	15873	0,05	0,04

Celkový obsah fenolických látek z listí u odrůdy 'Topaz' při extrakci metanol + kyselina mravenčí činí 61,18 mg/g a metanol + kyselina octová činí 47,53 mg/g

Tabulka č. 33: Stanovení a porovnání obsahu analytů z listí u odrůdy 'Bohemia Gold' při extrakci metanol + kyselina mravenčí a při extrakci metanol + kyselina octová

Bohemia Gold	Průměrná plocha píků (MeOH/mrav.)	Průměrná plocha píků (MeOH/oct.)	Koncentrace látky v (mg/g) sušeného listí	
			Extrakt (MeOH/mrav.)	Extrakt (MeOH/oct.)
Kyselina chlorogenová	489276	560185	1,60	1,83
Epikatechin	0	0	0	0
Rutin	34233	47232	0,15	0,21
Kvercitrin	987943	1275699	3,57	4,61
Floridzin	13956215	14314900	55,85	57,29
Kvercetin	0	0	0	0
Floretin	115785	116328	0,26	0,26

Celkový obsah fenolických látek z listí u odrůdy 'Bohemia Gold' při extrakci metanol + kyselina mravenčí činí 61,44 mg/g a metanol + kyselina octová činí 64,20 mg/g

Tabulka č. 34: Stanovení a porovnání obsahu analytů z listí u odrůdy 'Gloster' při extrakci metanol + kyselina mravenčí a při extrakci metanol + kyselina octová

Gloster	Průměrná plocha píků (MeOH/mrav.)	Průměrná plocha píků (MeOH/oct.)	Koncentrace látky v (mg/g) sušeného listí	
			Extrakt (MeOH/mrav.)	Extrakt (MeOH/oct.)
Kyselina chlorogenová	235361	210849	0,77	0,69
Epikatechin	0	0	0	0
Rutin	16324	14003	0,07	0,06
Kvercitrin	447732	436716	1,62	1,58
Floridzin	12652605	12718466	50,64	50,90
Kvercetin	0	0	0	0
Floretin	170479	173101	0,38	0,39

Celkový obsah fenolických látek z listí u odrůdy 'Gloster' při extrakci metanol + kyselina mravenčí činí 53,48 mg/g a metanol + kyselina octová činí 53,62 mg/g

Tabulka č. 35: Srovnání celkového množství fenolických látek v jednotlivých odrůdách v různých extraktech [mg/g]

Odrůda	Extrakce metanol + kyselina mravenčí	Extrakce metanol + kyselina octová
Melrose	50,06	48,04
Melodie	72,25	64,14
Rubinola	48,15	47,31
Průsvitné letní	58,38	56,04
Fragrance	54,88	46,42
Goldstar	49,11	44,05
Topaz	61,18	47,35
Bohemia Gold	61,44	64,20
Gloster	53,48	53,62

V listech byly nalezeny tyto fenolické látky: kyselina chlorogenová, rutin, kvercitrin, floridzin a floretin.

Na základě získaných hodnot je účinnějším rozpouštědlem metanol + 0,1% kyselina mravenčí.

6.5.1. Stanovení fenolických látek v kůře jabloní

K dispozici byly dostupné odrůdy jabloní: Melrose, Melodie, Topaz, Bohemia Gold, Gloster. Tyto vzorky byly sesbírány v lednu 2018. Zpracování vzorku je vyobrazeno v kapitole 5.4..

Tabulka č. 36: Stanovení obsahu analytů z kůry u odrůdy 'Melodie' při extrakci metanol + kyselina mravenčí

Melodie	Průměrná plocha piků	Koncentrace látky v (mg/g) sušené kůry
Kyselina chlorogenová	119152	1,55
Epikatechin	0	0
Rutin	42524	0,77
Kvercitrin	579545	8,38
Floridzin	5023279	80,41
Kvercetin	0	0
Floretin	7511	0,07

Celkový obsah fenolických látek u odrůdy 'Melodie' v kůře činí 91,19 mg/g.

Tabulka č. 37: Stanovení obsahu analytů z kůry u odrůdy 'Bohemia Gold' při extrakci metanol + kyselina mravenčí

Bohemia Gold	Průměrná plocha piků	Koncentrace látky v (mg/g) sušené kůry
Kyselina chlorogenová	222008	2,90
Epikatechin	0	0
Rutin	21785	0,39
Kvercitrin	398838	5,77
Floridzin	5546015	88,78
Kvercetin	0	0
Floretin	12198	0,11

Celkový obsah fenolických látek u odrůdy 'Bohemia Gold' v kůře činí 97,95 mg/g.

Tabulka č. 38: Stanovení obsahu analytů z kůry u odrůdy 'Melrose' při extrakci metanol + kyselina mravenčí

Melrose	Průměrná plocha píků	Koncentrace látky v (mg/g) sušené kůry
Kyselina chlorogenová	86131	1,12
Epikatechin	0	0
Rutin	0	0
Kvercitrin	211556	3,06
Floridzin	3026642	48,45
Kvercetin	0	0
Floretin	1275	0,01

Celkový obsah fenolických látek u odrůdy 'Melrose' v kůře činí 52,64 mg/g.

Tabulka č 39: Stanovení obsahu analytů z kůry u odrůdy 'Topaz' při extrakci metanol + kyselina mravenčí

Topaz	Průměrná plocha píků	Koncentrace látky v (mg/g) sušené kůry
Kyselina chlorogenová	170464	2,11
Epikatechin	0	0
Rutin	0	0
Kvercitrin	226970	2,56
Floridzin	3060978	48,51
Kvercetin	0	0
Floretin	897	0,01

Celkový obsah fenolických látek u odrůdy 'Topaz' v kůře činí 53,11 mg/g.

Tabulka č. 40: Stanovení obsahu analytů z kůry u odrůdy 'Gloster' při extrakci metanol + kyselina mravenčí

Gloster	Průměrná plocha piků	Koncentrace látky v (mg/g) sušené kůry
Kyselina chlorogenová	165685	2,16
Epikatechin	0	0
Rutin	0	0
Kvercitrin	365067	5,28
Floridzin	5939525	95,08
Kvercetin	0	0
Floretin	4718	0,04

Celkový obsah fenolických látek u odrůdy 'Gloster' v kůře činí 102,57 mg/g.

6.5.2. Stanovení fenolických látek v pupenech jabloní

K dispozici byly dostupné odrůdy jabloní: Melrose, Melodie, Topaz, Bohemia Gold, Gloster. Tyto vzorky byly sesbírány v lednu 2018. Zpracování vzorku je vyobrazeno v kapitole 5.4..

Tabulka č. 41: Stanovení obsahu analytů z pupenů u odrůdy 'Melodie' při extrakci metanol + kyselina mravenčí

Melodie	Průměrná plocha piků	Koncentrace látky v (mg/g) sušených pupenech
Kyselina chlorogenová	1699192	22,16
Epikatechin	0	0
Rutin	233719	4,23
Kvercitrin	2449302	35,42
Floridzin	13258099	212,24
Kvercetin	0	0
Floretin	99857	0,90

Celkový obsah fenolických látek u odrůdy 'Melodie' v pupenech činí 274,96 mg/g.

Tabulka č. 42: Stanovení obsahu analytů z pupenů u odrůdy 'Bohemia Gold' při extrakci metanol + kyselina mravenčí

Bohemia Gold	Průměrná plocha píků	Koncentrace látky v (mg/g) sušených pupenech
Kyselina chlorogenová	1055064	13,76
Epikatechin	0	0
Rutin	68347	1,24
Kvercitrin	794009	11,48
Floridzin	7985254	127,83
Kvercetin	0	0
Floretin	40679	0,37

Celkový obsah fenolických látek u odrůdy 'Bohemia Gold' v pupenech činí 154,68 mg/g.

Tabulka č 43: Stanovení obsahu analytů z pupenů u odrůdy 'Melrose' při extrakci metanol + kyselina mravenčí

Melrose	Průměrná plocha píků	Koncentrace látky v (mg/g) sušených pupenech
Kyselina chlorogenová	375306	4,89
Epikatechin	0	0
Rutin	0	0
Kvercitrin	372877	5,39
Floridzin	5154370	82,51
Kvercetin	0	0
Floretin	1064	0,01

Celkový obsah fenolických látek u odrůdy 'Melrose' v pupenech činí 92,81 mg/g.

Tabulka č 44: Stanovení obsahu analytů z pupenů u odrůdy 'Topaz' při extrakci metanol + kyselina mravenčí

Topaz	Průměrná plocha píků	Koncentrace látky v (mg/g) sušených pupenech
Kyselina chlorogenová	431771	5,35
Epikatechin	0	0
Rutin	0	0
Kvercitrin	397837	4,49
Floridzin	5135582	81,39
Kvercetin	0	0
Floretin	1027	0,01

Celkový obsah fenolických látek u odrůdy 'Topaz' v pupenech činí 91,24 mg/g.

Tabulka č. 45: Stanovení obsahu analytů z pupenů u odrůdy 'Gloster' při extrakci metanol + kyselina mravenčí

Gloster	Průměrná plocha píků	Koncentrace látky v (mg/g) sušených pupenech
Kyselina chlorogenová	511153	6,67
Epikatechin	0	0
Rutin	0	0
Kvercitrin	526576	7,62
Floridzin	5496504	87,99
Kvercetin	0	0
Floretin	1183	0,01

Celkový obsah fenolických látek u odrůdy 'Gloster' v pupenech činí 102,28 mg/g.

6.5.3. Srovnání obsahu fenolických látek v jednotlivých částech stromu u různých odrůd

Tabulka č. 46: Srovnání obsahu fenolických látek v jednotlivých částech stromu u odrůdy 'Melodie'

Melodie	Listí [mg/g]	Kůra [mg/g]	Pupeny [mg/g]
Kyselina chlorogenová	1,25	1,55	22,16
Rutin	0,10	0,77	4,23
Kvercitrin	5,56	8,38	35,42
Floridzin	64,96	80,71	212,24
Floretin	0,39	0,07	0,90
Celkem	72,26	91,48	274,96

Nejvíce fenolických látek u odrůdy 'Melodie' se nachází v pupenech.

Tabulka č. 47: Srovnání obsahu fenolických látek v jednotlivých částech stromu u odrůdy 'Bohemia Gold'

Bohemia Gold	Listí [mg/g]	Kůra [mg/g]	Pupeny [mg/g]
Kyselina chlorogenová	1,60	2,90	13,76
Rutin	0,15	0,39	1,24
Kvercitrin	3,57	5,77	11,48
Floridzin	55,85	88,78	127,83
Floretin	0,26	0,11	0,37
Celkem	61,43	97,95	154,68

Nejvíce fenolických látek u odrůdy 'Bohemia Gold' se nachází v pupenech.

Tabulka č. 48: Srovnání obsahu fenolických látek v jednotlivých částech stromu u odrůdy 'Melrose'

Melrose	Listí [mg/g]	Kůra [mg/g]	Pupeny [mg/g]
Kyselina chlorogenová	0,95	1,12	4,89
Rutin	0,07	0	0
Kvercitrin	1,04	3,06	5,39
Floridzin	47,60	48,45	82,51
Floretin	0,37	0,01	0,01
Celkem	50,04	52,64	92,8

Nejvíce fenolických látek u odrůdy 'Melrose' se nachází v pupenech.

Tabulka č. 49: Srovnání obsahu fenolických látek v jednotlivých částech stromu u odrůdy 'Topaz'

Topaz	Listí [mg/g]	Kůra [mg/g]	Pupeny [mg/g]
Kyselina chlorogenová	4,65	2,21	5,39
Rutin	0,11	0	0
Kvercitrin	4	2,26	4,49
Floridzin	52,38	48,51	81,39
Floretin	0,05	0,01	0,01
Celkem	61,19	52,99	91,28

Nejvíce fenolických látek u odrůdy 'Topaz' se nachází v pupenech.

Tabulka č. 50: Srovnání obsahu fenolických látek v jednotlivých částech stromu u odrůdy 'Gloster'

Gloster	Listí [mg/g]	Kůra [mg/g]	Pupeny [mg/g]
Kyselina chlorogenová	0,77	2,16	6,67
Rutin	0,07	0	0
Kvercitrin	1,62	5,28	7,62
Floridzin	50,64	95,88	87,99
Floretin	0,38	0,01	0,01
Celkem	53,48	103,33	102,29

Nejvíce fenolických látek u odrůdy 'Gloster' se nachází v kůře.

6.5.4. Srovnání obsahu floridzinu v jednotlivých částech stromu u různých odrůd

Pro přehled srovnání jednotlivých odrůd jabloní z hlediska obsahu nejvíce zastoupeného floridzinu je níže uvedena souhrnná tabulka srovnávající jeho obsah mezi různými odrůdami a v různých částech stromu.

Tabulka č. 51: Srovnání obsahu floridzinu v listí, kůře a pupenech v jednotlivých odrůdách

Floridzin	Listí [mg/g]	Kůra [mg/g]	Pupeny [mg/g]
Melodie	64,96	80,71	212,24
Bohemia Gold	55,85	88,78	127,83
Melrose	47,60	48,45	82,51
Topaz	52,38	48,51	81,39
Gloster	50,64	95,88	87,99

Největší množství floridzinu v listech se nachází u odrůdy 'Melodie', v kůře se nachází nejvíce floridzinu u odrůdy 'Gloster' a v pupenech se nejvíce floridzinu nachází u odrůdy 'Melodie'.

7. ZÁVĚR A DISKUZE

Tato diplomová práce se zabývala optimalizací a validací HPLC metody pro stanovení fenolických látek v listech různých odrůd z rodu *Malus*. Konkrétně byly separovány a stanoveny tyto látky: floridzin, floretin, kyselina chlorogenová, rutin a kvercitrin.

Nejprve byla vybrána vhodná kolona. Na základě symetrie píků, účinnosti chromatografické separace a rozlišení všech analytů byla využita kolona YMC-Triart C18 ExRS 150 x 4,6 mm x 5μm, 8 nm. Byla využita lineární gradientová eluce s použitím mobilní fáze tvořenou organickou složkou (ACN) a vodnou složkou s přidavkem kyseliny fosforečné (pH = 2,2).

Druhým krokem bylo určení absorpčních maxim jednotlivých analytů. Na základě těchto hodnot byla vybrána vhodná vlnová délka k jejich stanovení. Floridzin a floretin byl stanovován při vlnové délce 280 nm, rutin a kvercitrin při 354 nm a kyselina chlorogenová při 327 nm. K detekci byl využit DAD detektor.

Identifikace jednotlivých analytů v rostlinných extraktech byla provedena porovnáním retenčních časů se standardními látkami.

Mezi validační parametry v této práci patřila linearita, opakovatelnost, výtěžnost a přesnost. Korelační koeficient pro floridzin byl 0,993; pro floretin 0,998; pro kyselinu chlorogenovou 0,997; pro rutin 0,998 a pro kvercitrin 0,996. Opakovatelnost se stanovovala při různých koncentračních hladinách. Při koncentraci 20 mg/l činila hodnota RSD pro floretin, rutin, kvercitrin, kyselinu chlorogenovou od 0,46 do 1,37 %. Pro koncentraci 100 mg/l byla hodnota RSD od 0,68 do 0,91 %. Při koncentraci 250 mg/l byla hodnota RSD od 1,59 do 1,67 %. Opakovatelnost pro floridzin byla stanovována při koncentraci 1000, 4000, 8000 mg/l a hodnoty RSD činily 0,34, 0,51, 0,76 %. Parametr přesnosti dosahoval hodnot RSD pro floridzin 2,07 %, pro floretin 4,56 %, pro rutin 4,21 %, pro kvercitrin 3,23 %, pro kyselinu chlorogenovou 2,41 %. Výtěžnost floridzinu byla 88,74 %, floretinu 90,44 %, kyseliny chlorogenové 123,21 %, rutinu 97,25 % a kvercitrinu 86,54 %.

V práci bylo stanoveno množství jednotlivých látek v listech různých odrůd. Největší zastoupení tvořil floridzin, který zaujímal přes 90 % všech fenolických

látek. Například v odrůdě 'Melodie' byl celkový počet fenolických látek v listech 72,25 mg/g a z toho 64,96 mg/g tvořil floridzin.

Byly porovnány 2 typy extrakčního činidla: metanol + 0,1% kyselina mravenčí nebo metanol + 0,1% kyselina octová. U každé odrůdy se porovnával zisk fenolických látek v obou typech extrakcí. Větších výtěžností bylo dosaženo u extrakce s použitím metanolu a 0,1% kyseliny mravenčí.

Velké množství floridzinu v listech bylo překvapující. Proto byly vzorky z této práce přeměřeny na hmotnostním spektrometru PharmDr. Viktorem Voříškem ve spolupráci s doc. Alešem Hornou a firmou Radanal. Naměřené koncentrace floridzinu byly řádově potvrzeny. Výsledky se pohybovaly v rozmezí od 27,11 mg/g do 56,58 mg/g. Především z časových důvodů nebyla však metoda dostatečně navržena a validována. Proto tato analýza slouží jen pro informativní účely a v této diplomové práci není rozebírána, ale je předmětem dalšího vývoje.

Rovněž byly stanoveny fenolické látky v kůře a pupenech. V pupenech byla zjištěna zvýšená koncentrace všech fenolických látek ve srovnání s listím a kůrou. Například v pupenech odrůdy 'Melodie' se floridzin nacházel v koncentraci 212,24 mg/g a v kůře 80,41 mg/g. Nicméně nevýhodou kůry a pupenů je nepříliš snadná dostupnost ve srovnání s listím.

V teoretické části byla uvedena charakterizace fenolických látek, ale převážná část se věnovala floridzinu. Byla uvedena jeho chemická struktura, biosyntéza, osud v organismu, nejnovější studie o využití této látky a možnostech extrakce. Další část byla věnována popisu metody HPLC a možnostem detekce fenolických látek. Rovněž byla uvedena krátká rešerše odborných publikací týkající se analýzy fenolických látek.

Listí je odpadní produkt, a proto může sloužit jako lehce dostupný zdroj pro výrobu potravních suplementů obohacené o floridzin. Ten, stejně jako ostatní fenolické látky, má spoustu příznivých účinků na zdraví. Jeho velké využití však spočívá ve snížení hyperglykémie a zdá se být účinný v prevenci proti diabetu.

8. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1: Struktura flavanu	13
Obrázek č. 2: Struktura floridzinu	15
Obrázek č. 3: Biosyntéza floridzinu	16
Obrázek č. 4: Schéma zastoupení fenolických látek v jablku.....	17
Obrázek č. 5: Schéma extrakce.....	18
Obrázek č. 6: Vliv části jablka na postprandiální zvýšení glukózy.....	21
Obrázek č. 7: Efekt jablečného prášku na metabolismus glukózy během OGTT	22
Obrázek č. 8: Schématické znázornění (a) přípravy MMIPs, (b) extrakce floridzinu z listů a plazmy	25
Obrázek č. 9: Schéma HPLC systému	27
Obrázek č. 10: Absorpční spektrum kyseliny chlorogenové	38
Obrázek č. 11: Absorpční spektrum rutinu	38
Obrázek č. 12: Absorpční spektrum kvercitrinu.....	39
Obrázek č. 13: Absorpční spektrum floretinu.....	39
Obrázek č. 14: Absorpční spektrum floridzinu.....	40
Obrázek č. 16: Chromatogramy reálného vzorku listů jabloně	42
Obrázek č. 17: Kalibrační závislost pro floretin	44
Obrázek č. 18: Kalibrační závislost pro kyselinu chlorogenovou	45
Obrázek č. 19: Kalibrační závislost pro rutin	46
Obrázek č. 20: Kalibrační závislost kvercitrinu.....	47
Obrázek č. 21: Kalibrační závislost floridzinu	48

9. SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 1: Fenolové sloučeniny v jablku	14
Tabulka č. 2: Zastoupení fenolických látek v jednotlivých extrakcích	19
Tabulka č. 3: MIC testovaných dehydrochalkonů. Hodnoty jsou vyjádřeny v $\mu\text{g/ml}$ a reprezentují průměr tří stanovení	23
Tabulka č. 4: Přehled dřívějších studií a podmínky separací	32
Tabulka č. 5: Chromatografický systém	33
Tabulka č. 6: Příprava roztoku pro kalibraci pro kyselinu chlorogenovou, rutin, kvercitrin, floretin	35
Tabulka č. 7: Příprava pracovních roztoků pro kalibraci pro floridzin	35
Tabulka č. 8: Příprava pracovních roztoků pro kyselinu chlorogenovou, rutin, kvercitrin, floretin pro test opakovatelnosti	36
Tabulka č. 9: Příprava pracovních roztoků pro floridzin pro test opakovatelnosti	37
Tabulka č. 10: Parametry testu vhodnosti chromatografického systému	43
Tabulka č. 11: Test linearit pro floretin	44
Tabulka č. 12: Parametry lineární regrese pro floretin	44
Tabulka č. 13: Test linearit pro kyselinu chlorogenovou	45
Tabulka č. 14: Parametry pro lineární regresi kyseliny chlorogenové	45
Tabulka č. 15: Test linearit pro rutin	46
Tabulka č. 16: Parametry pro lineární regresi rutinu	46
Tabulka č. 17: Test linearit pro kvercitrin	47
Tabulka č. 18: Parametry pro lineární regresi kvercitrinu	47
Tabulka č. 19: Kalibrační závislost pro floridzin	48
Tabulka č. 20: Parametry pro lineární regresi floridzinu	48
Tabulka č. 21: Opakovatelnost plochy píků pro floretin, rutin, kvercitrin, kyselinu chlorogenovou při koncentraci 20 mg/l a pro floridzin při koncentraci 1000 mg/l	49
Tabulka č. 22: Opakovatelnost plochy píků pro floretin, rutin, kvercitrin, kyselinu chlorogenovou při koncentraci 100 mg/l	50
Tabulka č. 23: Opakovatelnost plochy píků pro floretin, rutin, kvercitrin, kyselinu chlorogenovou při koncentraci 250 mg/l	50
Tabulka č. 24: Hodnoty pro výpočet výtěžnosti	51
Tabulka č. 25: Hodnoty pro výpočet přesnosti	52

Tabulka č. 26: Stanovení a porovnání obsahu analytů z listí u odrůdy 'Melrose' při extrakci metanol + kyselina mravenčí a při extrakci metanol + kyselina octová..	54
Tabulka č. 27: Stanovení a porovnání obsahu analytů z listí u odrůdy 'Melodie' při extrakci metanol + kyselina mravenčí a při extrakci metanol + kyselina octová..	54
Tabulka č. 28: Stanovení a porovnání obsahu analytů z listí u odrůdy 'Rubinola' při extrakci metanol + kyselina mravenčí a při extrakci metanol + kyselina octová..	55
Tabulka č. 29: Stanovení a porovnání obsahu analytů z listí u odrůdy 'Průsvitné letní' při extrakci metanol + kyselina mravenčí a při extrakci metanol + kyselina octová.....	55
Tabulka č. 30: Stanovení a porovnání obsahu analytů z listí u odrůdy 'Fragrance' při extrakci metanol + kyselina mravenčí a při extrakci metanol + kyselina octová	56
Tabulka č. 31: Stanovení a porovnání obsahu analytů z listí u odrůdy 'Goldstar' při extrakci metanol + kyselina mravenčí a při extrakci metanol + kyselina octová..	56
Tabulka č. 32: Stanovení a porovnání obsahu analytů z listí u odrůdy 'Topaz' při extrakci metanol + kyselina mravenčí a při extrakci metanol + kyselina octová..	57
Tabulka č. 33: Stanovení a porovnání obsahu analytů z listí u odrůdy 'Bohemia Gold' při extrakci metanol + kyselina mravenčí a při extrakci metanol + kyselina octová.....	57
Tabulka č. 34: Stanovení a porovnání obsahu analytů z listí u odrůdy 'Gloster' při extrakci metanol + kyselina mravenčí a při extrakci metanol + kyselina octová..	58
Tabulka č. 35: Srovnání celkového množství fenolických látek v jednotlivých odrůdách v různých extraktech [mg/g]	59
Tabulka č. 36: Stanovení obsahu analytů z kůry u odrůdy 'Melodie' při extrakci metanol + kyselina mravenčí	60
Tabulka č. 37: Stanovení obsahu analytů z kůry u odrůdy 'Bohemia Gold' při extrakci metanol + kyselina mravenčí	60
Tabulka č. 38: Stanovení obsahu analytů z kůry u odrůdy 'Melrose' při extrakci metanol + kyselina mravenčí	61
Tabulka č. 39: Stanovení obsahu analytů z kůry u odrůdy 'Topaz' při extrakci metanol + kyselina mravenčí	61
Tabulka č. 40: Stanovení obsahu analytů z kůry u odrůdy 'Gloster' při extrakci metanol + kyselina mravenčí	62

Tabulka č. 41: Stanovení obsahu analytů z pupenů u odrůdy 'Melodie' při extrakci metanol + kyselina mravenčí	62
Tabulka č. 42: Stanovení obsahu analytů z pupenů u odrůdy 'Bohemia Gold' při extrakci metanol + kyselina mravenčí	63
Tabulka č 43: Stanovení obsahu analytů z pupenů u odrůdy 'Melrose' při extrakci metanol + kyselina mravenčí	63
Tabulka č 44: Stanovení obsahu analytů z pupenů u odrůdy 'Topaz' při extrakci metanol + kyselina mravenčí	64
Tabulka č. 45: Stanovení obsahu analytů z pupenů u odrůdy 'Gloster' při extrakci metanol + kyselina mravenčí	64
Tabulka č. 46: Srovnání obsahu fenolických látek v jednotlivých částech stromu u odrůdy 'Melodie'	65
Tabulka č. 47: Srovnání obsahu fenolických látek v jednotlivých částech stromu u odrůdy 'Bohemia Gold'	65
Tabulka č. 48: Srovnání obsahu fenolických látek v jednotlivých částech stromu u odrůdy 'Melrose'	66
Tabulka č. 49: Srovnání obsahu fenolických látek v jednotlivých částech stromu u odrůdy 'Topaz'	66
Tabulka č. 50: Srovnání obsahu fenolických látek v jednotlivých částech stromu u odrůdy 'Gloster'	67
Tabulka č. 51: Srovnání obsahu floridzinu v listí, kůře a pupenech v jednotlivých odrůdách.....	67

10. ZDROJE

- [1] BONDONNO, P. N.: The cardiovascular health benefits of apples: Whole fruit vs. isolated compounds. *Trends in Food Science & Technology*, 2017, 69, 243-256
- [2] FALCONE FERREYRA, M.L., RIUS, S. P. et al: Flavonoids: biosynthesis, biological function and biotechnological application. *Frontiers in Plant Science*, 2012, 3, 222
- [3] SPILKOVÁ, J. a kol.: *Farmakognosie*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2016. s. 102. ISBN 978-80-246-3264-3
- [4] HAJŠLOVÁ, J., VELÍŠEK, J.: *Chemie potravin II*. 3. vydání. Tábor: Osis, 2009, 644 s, ISBN 978-80-86659-16-9
- [5] https://www.researchgate.net/figure/273297535_fig1_Fig-1-Chemical-structure-of-the-flavan-nucleus-adapted-from-www-mdpicom
- [6] RANA, S., BHUSHAN, S.: Apple phenolics as nutraceuticals: assessment, analysis and application. *Journal of food science and technology*, 2016, 53, 4, 1727-1738
- [7] DE KONINCK, L.: Ueber das Phloridzin (Phlorrhizin). In: Geiger, L.P., Liebig, J., Trommsdorff, J.B. (Eds.), *Annalen der Pharmacie*, Band XV, Universitäts-Buchhandlung von C. F. Winter, Heidelberg, pp,1835, 75-77
- [8] BLASCHEK, W.: Natural Products as Lead Compounds for Sodium Glucose Cotransporter (SGLT) Inhibitors. *Planta medica*, 2017, 83, 12/13, 985-993
- [9] ROZMER, Z., PERJÉSI, P.: Naturally occurring chalcones and their biological activities. *Phytochemistry review*, 2016, 15, 87-120
- [10] GOSCH, CH., HALBWIRTH, H. et al.: Phloridzin. Biosynthesis, distribution and physiological relevance in plants. *Phytochemistry*, 2010, 71, 838-843
- [11] SLANINA, J., TÁBORSKÁ, E.: Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. *Chemické listy*, 2004, 98, 239-245
- [12] CRESPIY, V., APRIKIAN, O. et al.: Bioavailability of phloretin and phloridzin in rats. *The Journal of Nutrition*, 2001, 131, 12, 3227-3230
- [13] MASUMOTO, S., AKIMOTO, Y. et al.: Dietary Phloridzin Reduces Blood Glucose Levels and Reverses Sglt1 Expression in the Small Intestine in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 2009, 57, 5651-4656
- [14] XU, Y., FAN, M. et al.: Variation in phenolic compounds and antioxidant activity in apple seeds of seven cultivars. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2016, 23, 3, 379-388

- [15] CHEN, CH-S., ZHANG, D. et al.: Effects of fruit bagging on the contents of phenolic compounds in the peel and flesh of ‘Golden Delicious’, ‘Red Delicious’, and ‘Royal Gala’ apples. *Scientia Horticulturae*, 2012, 142, 68-73
- [16] MARKOWSKI, J., PLOCHARSKI, W.: Determination of phenolic compounds in Apples and processed apple products. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 2006, 14, 2, 133-142
- [17] FRANCIANI, 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
- [18] SOWA, A., ZGÓRKA, G. et al.: Analysis of polyphenolic compounds in extracts from leaves of some *Malus domestica* Cultivars: Antiradical and antimicrobial analysis off these extracts. *BioMed Research International*, 2016, 12 pages
- [19] RANA, S., KUMAR, S. et al.: Phenolic constituents from apple tree leaves and their in vitro biological activity. *Industrial Crops and Products*, 2016, 90, 118-125
- [20] LIAUDANSKAS, M., VIŠKELIS, P. et al: Phenolic Composition and Antioxidant Activity of *Malus domestica* Leaves. *The Scientific World Journal*, 2014, 10 pages
- [21] HILT, P., SCHIEBER, A. et al: Detection of phloridzin in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) by HPLC-PDA-MS/MS and NMR spectroscopy. *J Agric Food Chem*, 2003, 51, 2896-2899
- [22] GOSCH, C., HALBWIRTH, H. et al: Cloning and heterologous expression of glycosyltransferases from *Malus x domestica* and *Pyrus communis*, which convert phloretin to phloretin 2'-O-glucoside (phloridzin). *Plant Sci* 2010, 178, 299-306
- [23] HVATTUM E.: Determination of phenolic compounds in rose hip (*Rosa canina*) using liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry and diode-array detection. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2002, 16, 655-662
- [24] HERTOOG, M.G., KROMHOUT, D. et al.: Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch intern med*. 1995, 155, 381-386
- [25] THILAKARATHNA, S. H., RUPASINGHE, H. P. V. et al: Apple peel bioactive rich extracts effectively inhibit in vitro human LDL cholesterol oxidation. *Food chemistry*, 2013, 138 (1), 463-470
- [26] GEORGE, V.C., RUPASINGHE, H.P.V.: Apple Flavonoids Suppress Carcinogen-Induced DNA Damage in Normal Human Bronchial Epithelial Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017
- [27] GAUCHER, M., LOHOU, D.: Histolocalization and physico-chemical characterization of dihydrochalcones: Insight into the role of apple major flavonoids. *Phytochemistry*, 2013, 90, 78-89

- [28] BERÁNEK, M., TICHÝ, M. a kol.: Vybrané kapitoly z klinické biochemie. 1. vydání, Praha: Karolinum, 2013, 197 s., ISBN 978-80-246-2186-9
- [29] EDELSBERGER, T.: Glykoretika (inhibitory SGLT2, glifloziny) v léčbě diabetu. Remedia [online]. 2011, 1 [cit. 21.10.2017]. Dostupné z: <http://www.remedia.cz/Clanky/Prehledy-nazory-diskuse/Glukoretika-inhibitory-SGLT2-glifloziny-v-lecbe-diabetu/6-F-11R.magarticle.aspx>
- [30] MUDALIAR, S. et al: Sodium–Glucose Cotransporter Inhibitors: Effects on Renal and Intestinal Glucose Transport. American Diabetes Association, 2015, 38 (12), 2344-2353
- [31] SHIROSAKI, M., KOYAMA, T.: Apple leaf extract as a potencional candidate for suppressing postprandial elevation of the blood glucose level. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 2012, 58 (1), 63-67
- [32] KHALIFA, M., BAKR, A. et al: Protective effects of phloridzin against methotrexate-induced liver toxicity in rats. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017, 95, 529-535
- [33] BARRECA, D., et al.: Biochemical and antimicrobial aktivty of phloretin and its glycosilated derivatives present in apple and kumquat. Food chemistry, 2014, 160, 292-297
- [34] SKLENÁŘOVÁ H.: Separální analytické metody – úvod, princip, rozdělení, dostupné z: https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/223859/mod_resource/content/3/Separacni_analyticke_metody_uvod.pdf [Citace: 23. 9. 2017]
- [35] NOVÁKOVÁ L., DOUŠA M.: Moderní HPLC separace v teorii a praxi. 1. vydání, Europrint a.s., 2013, 32-56, ISBN 978-80-260-4243-3
- [36] ACWORTH, I.N., NAOI, M., et al: Coulometric electrode array detectors for HPLC. Progress in HPLC-HPCE, 1997, 6, 27-34
- [37] MARCANÍKOVÁ, K., BEŇOVÁ, B.: využití coulometrického detektoru pro analýzu fenolických látek. Chemické listy, 2010, 104, 27-30
- [38] BAYRAM, B., OZCELIK, B. et al: A validated method for the determination of selected phenolics in olive oil using high-performance liquid chromatography with coulometric electrochemical detection and a fused-core column. Food Chemistry, 2013, 138, 1663-1669
- [39] JANDERA, P., ŠKERŇÍKOVÁ, V. et al: RP-HPLC analysis of phenolic compounds and flavonoids in beverages and plant extracts using a CoulArray detector. Journal of separation science, 2005, 28, 1005-1022
- [40] SCHIEBER, A., KELLER, P. et al.: Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. Journal of chromatography A. 2001, 910, 265-273
- [41] LIAUDANSKAS, M., VIŠKELIS, P. et al: Application of an Optimized HPLC Method for the Detection of Various Phenolic Compounds in Apples from Lithuanian Cultivars. Journal of Chemistry, 2014, vol. 2014, 10 pages

- [42] BAI, L., GUO, S. et al: Characterization of nine polyphenols in fruits of *Malus pumila* Mill by high-performance liquid chromatography. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2016, 24 (2), 293-298
- [43] ASAMI, D.K., HONG, Y.J. et al: Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51, 1237-1241
- [44] MAŇÁSKOVÁ, V.: Extrakce fenolových kyselin z rostlinných potravin pevného charakteru (Diplomová práce), UTB, Zlín
- [45] NACZK, M., SHAHIBI, F.: Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of chromatography A*, 2004, 1054, 95-111
- [46] MACHÁLKOVÁ, I.: Srovnání metod stanovení veškerých polyfenolů (Diplomová práce), Zahradnická fakulta, Mendelova Univerzita, Brno
- [47] GAO, D., WANG D. D. et al: Preparation and evaluation of magnetic molecularly imprinted polymers for the specific enrichment of phloridzin. *Talanta*, 2018, 178, 299-307
- [48] CVAČKA, J.: Detekce ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii. Prezentace. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc3.pdf>
- [49] MAKAROVA, E, GÓRNAŚ, P. et al: 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*, 2015, 95(3), 560-568
- [50] KOUTSOS, A., LIMA, M. et al: Effects of Commercial Apple Varieties on Human Gut Microbiota Composition and Metabolic Output Using an In Vitro Colonic Model. *Nutrients*, 2017, 9 (6), 533
- [51] FRIEDECKÝ, B., ŠPRONGL, L., et al: Doporučení k provádění validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích, 2010. ČSKB. Dostupné z: http://www.cskb.cz/res/file/doporuceni/valid/Validace_2010.pdf
- [52] Hplc.cz, Definice: konfirmace – kvalifikace – validace, dostupné na: <http://www.hplc.cz/validace/definice.html> (citace 2. 1. 2018)
- [53] Hplc.cz, Validační parametry. Dostupné z: http://www.hplc.cz/validace/program_validace.htm#_3._Valida%C4%8Dn%C3%AD_parametry (citace 2. 1. 2018)

