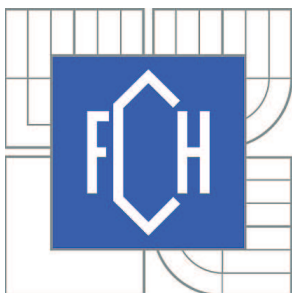


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

EXTRAKCE VYBRANÝCH FLAVONOIDŮ BEZU ČERNÉHO PRO POTRAVINÁŘSKÉ ÚČELY

EXTRACTION OF SELECTED ELDERBERRY FLAVONOIDS FOR FOOD INDUSTRY PURPOSES

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

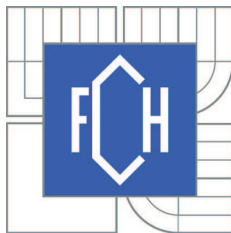
AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. HANA GRULICHOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

RNDr. MILENA VESPALCOVÁ, Ph.D.

BRNO 2010



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0358/2009	Akademický rok: 2009/2010
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Hana Grulichová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.	
Konzultanti:	Ing. Pavel Karásek	

Název diplomové práce:

Extrakce vybraných flavonoidů bezu černého pro potravinářské účely

Zadání diplomové práce:

Teoretická část:

- 1) Charakteristika bezu černého
- 2) Chemické vlastnosti, význam a použití flavonoidů rutinu a kvercetinu
- 3) Popis extrakční techniky PSE (pressurized solvent extraction)
- 4) Přehled HPLC systémů pro separaci rutinu a kvercetinu

Experimentální část:

- 1) Ověření vybraného separačního systému na standardech
- 2) Extrakce rostlinného materiálu technikou PSE
- 3) HPLC analýzy rostlinných extraktů
- 4) Vyhodnocení provedených experimentů

Termín odevzdání diplomové práce: 14.5.2010

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Hana Grulichová
Student(ka)

RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2009

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

SOUHRN

Tato diplomová práce se zabývá stanovením množství rutinu a kvercetinu v listech a ve větvičkách různých druhů bezu černého. Zjištěné hodnoty byly porovnány s významnými zdroji těchto látek.

Pro získání látek z rostlinné matrice byla použita metoda extrakce rozpouštědlem za zvýšeného tlaku a teploty (PSE – pressurized solvent extraction, PHWE – pressurized hot water extraction). Podmínky použité pro extrakci pomocí PSE byly teplota 120 °C, tlak 150 barů a 3 cykly po 5 minutách. U extrakce pomocí PHWE byla pro rutin z listů použita teplota 80 °C, tlak 150 barů, 3 cykly po 5 minutách a pro kvercetin se použila teplota 100 °C, ostatní podmínky se nastavily stejně.

Analýza rutinu a kvercetinu byla provedla pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie s použitím detektoru diodovým polem (HPLC-DAD), ale byla sledována pouze vlnová délka 360 nm. Látky byly separované přes kolonu SUPELCOSILTM LC-8DB (velikost částic sorbentu 5 µm; rozměry kolony 250x4,6 mm). Mobilní fáze byla směs methanolu: vody: kyseliny mravenčí v poměru 36: 61,5: 2,5 při pH 2,17-2,28, nastavený průtok byl 0,7 ml/min a velikost dávkovací smyčky 10 µl.

Nejvíce rutinu bylo obsaženo v listech planého druhu bezu černého při extrakci methanolem i vodou. Vodou byla extrakce účinnější a bylo získáno 5,58 mg rutinu z jednoho gramu vzorku planého bezu černého. Nejnižší množství bylo stanoveno v *Sambucus nigra* Körsör, kde bylo pouze 0,13 mg/g (při extrakci vodou). Kvercetin nebyl v listech stanoven u žádného druhu bezu černého.

Ve větvích se nacházely oba stanovované flavonoidy. Rutin byl ve velmi malém množství stanoven v planém druhu, ale ve šlechtěných odrůdách bylo stanoveno významné množství této látky. Naopak kvercetin, který se po stanovování optimálních podmínek pro extrakci zdál být významnějším z hlediska množství, nebyl v některých šlechtěných odrůdách detekován. Největší množství kvercetinu se nacházelo v planém druhu bezu černého, a to 0,24 mg/g. Největší množství rutinu bylo stanoveno v *Sambucus nigra* Albida, 2,33 mg/g.

Klíčová slova: PSE, PHWE, SPE, HPLC, rutin, kvercetin, bez černý

SUMMARY

Amount of rutin and quercetin in bark and leaves from different type of *Sambucus nigra* was determined in this diploma thesis. Records of amounts were compared with amounts in significant sources of these flavonoids.

Matters from raw matrix were obtained with pressurized solvent extraction (PSE) and pressurized hot water extraction (PHWE). There was use temperature 120°C, pressure 150 bar, three times 5-min cycles for PSE. There were used 80°C, 150 bar, three 5-min cycles for rutin extracted with PHWE and the same condition were used for extraction of quercetin only the temperature was changed to 100 °C.

Analysis of rutin and quercetin were carry out high performance liquid chromatography (HPLC) with diode array detection (DAD), where was used SUPELCOSIL™ LC-8DB column (5µm; 250 x 4.6 mm). Methanol: water: formic acid (36: 61.5: 2.5, pH 2.17-2.28) was used like a mobile phase. The flow of the mobile phase was set up 0.7 ml/min. Size of sample was 10 µl.

The most amount of rutin was determined in the leaves of wild kind of *Sambucus nigra* with methanol extraction and hot water too. Extraction with PHWE was more effectively. There were determined 5.58 mg of rutin in one gram of sample from wild *Sambucus nigra*. There were determined the smallest amount of rutin in *Sambucus nigra* Körsör. There was found only 0.13 mg/g with extraction PHWE. The quercetin wasn't determined in any *Sambucus nigra* leaves.

There were found both of the flavonoids (rutin and quercetin) in the branch of *Sambucus nigra*. The rutin was determined in the small amount in wild kind but it was found in the important amount in *Sambucus nigra* cultivar. Whereas the quercetin was found in higher concentration than rutin when was finding the ideal conditions for extraction of branch. The quercetin was chosen like more important in light of amount. In the end the quercetin wasn't detected in any *Sambucus nigra* cultivars. The most amount of quercetin was determined in wild sambucus nigra, 0.24 mg/g. The most amount of rutin was found in *Sambucus nigra* Albida, 2.33 mg/g.

Keywords: PSE, PHWE, SPE, HPLC, rutin, quercetin, *Sambucus nigra*

GRULICHOVÁ, H. *Extrakce vybraných flavonoidů bezu černého pro potravinářské účely*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 70 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
Podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucí diplomové práce RNDr. Mileně Vespalcové Ph.D za vstřícný přístup a všestrannou pomoc při realizaci této diplomové práce.

1 Úvod	11
2 Teoretická část	12
2.1 Bez černý.....	12
2.1.1 Vlastnosti	12
2.1.2 Léčivé účinky.....	14
2.2 Flavonoidy	15
2.2.1 Struktura	15
2.2.2 Význam	15
2.2.3 Biosyntéza.....	17
2.2.4 Kvercetin	18
2.2.4.1 Chemická struktura a přírodní zdroje	18
2.2.4.2 Farmakologické účinky	18
2.2.4.3 Absorpce v organismu	19
2.2.5 Rutin	19
2.2.5.1 Chemická struktura a přírodní zdroje	19
2.2.5.2 Biologická a farmakologická aktivita.....	20
2.3 PSE – pressurized solvent extraction	21
2.3.1 Princip metody	21
2.3.2 One PSE a Fast PSE	25
2.3.2.1 One PSE [28]	25
2.3.2.2 Fast PSE [28]	26
2.4 PHWE – extrakce horkou vodou za zvýšeného tlaku.....	27
2.5 SPE – solid phase extraction (extrakce pevnou fází)	28
2.6 HPLC Flavonoidů	29
2.6.1 Princip vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC)	29
2.6.2 Použití při analýze flavonoidů	30
2.6.2.1 HPLC podmínky pro rutin.....	31
2.6.2.2 HPLC podmínky pro kvercetin	32
2.6.2.3 HPLC podmínky pro kvercetin a rutin ve směsi	34
3 Experimentální část.....	36
3.1 Pomůcky.....	36
3.2 Přístroje.....	36
3.3 Chemikálie.....	37
3.4 Optimalizace separačního systému na standardech	37
3.4.1 Příprava mobilní fáze.....	37

3.4.2	Příprava roztoků standardů pro optimalizaci separační metody	38
3.5	Úprava rostlinných matric	38
3.6	Metody.....	38
3.6.1	PSE a PHWE.....	38
3.6.2	SPE-solid phase extraction (extrakce na pevné fázi)	39
3.6.3	HPLC	39
3.6.4	Příprava kalibrační křivky	39
3.6.4.1	Rutin	39
3.6.4.2	Kvercetin	39
3.6.4.3	Přepočet koncentrace látek na 1 gramu vzorku	40
4	Výsledky a diskuse.....	41
4.1	Optimalizace podmínek pro extrakci metodou PSE	41
4.1.1	Listy.....	41
4.1.2	Větvičky	42
4.2	Optimalizace separačního systému HPLC.....	44
4.2.1	Testování poměru MeOH v mobilní fázi	44
4.2.2	Přídavek vody do standardů.....	44
4.2.3	Změna kyseliny octové na kyselinu mravenčí.....	46
4.2.4	Mobilní fáze se směsí AcCN a MeOH.....	48
4.2.5	Nástřik zkušebního reálného vzorku	48
4.3	Mez detekce a mez stanovitelnosti	48
4.3.1	Rutin	48
4.3.2	Kvercetin	49
4.4	Kalibrační křivky.....	51
4.4.1	Rutin	51
4.4.2	Kvercetin	51
4.5	Obsah látek v listech bezu černého.....	52
4.5.1	Rutin v listech.....	52
4.5.2	Kvercetin v listech	55
4.6	Obsah látek ve větvičkách bezu černého	56
4.6.1	Kvercetin ve větvičkách	57
4.6.2	Rutin ve větvičkách	58
5	Závěr	60
6	Odkazy	62
7	Přílohy.....	67

1 Úvod

Bez černý se řadí mezi významné léčivé rostliny používané v lidovém léčitelství snad odjakživa. Léčebné účinky byly prokázány u všech částí tohoto statného keře. Tyto účinky se přisuzují flavonoidům, které jsou v bezu obsažené. Nejsou však popsány a prozkoumány obsahy všech látek ve celé této rostlině. Květy a plody jsou více prozkoumané, a proto byla pozornost věnována spíše méně tradičním částem jako jsou listy a větvičky.

V poslední době je snaha zakládat sady se šlechtěnými odrůdami bezu černého, z kterých se využívají plody a květy pro potravinářské nebo farmaceutické účely. Větve a listy jsou brány jako odpadní materiál. Aby mohly být větve a listy ekonomičtěji využity, jsou stanovovány látky obsažené v těchto částech šlechtěných druhů bezu černého. Zjištěné množství je porovnáváno s významnými zdroji těchto látek, aby se mohla daná odrůda případně využít jako důležitý zdroj biologicky účinných látek.

Flavonoidy jsou významné farmakologicky a biologicky účinné látky, obsažené v rostlinách jako jejich sekundární metabolity. Jsou pro rostliny potřebné, protože napomáhají jako obrana proti různým škůdcům, virům a bakteriím. Jsou příčinou pestrosti přírody, protože způsobují zbarvení rostlin. Dodnes je známo přes 4000 různých flavonoidů rozdělených do několika podskupin. Z této velmi bohaté skupiny sekundárních metabolitů byly pro analýzu vybrány rutin a kvercetin, které se řadí do podskupiny flavonolů.

V diplomové práci se stanovovaly flavonoidy vyextrahované z větviček a listů bezu černého. Větvičky jsou každý rok stříhány, aby docházelo k omlazování keře a aby byl keř schopný dostatečné výživy všech svých částí. Odstřižené větve jsou však většinou zlikvidovány jako odpadní materiál. Využití odpadu jako zdroje farmakologicky účinných látek by bylo ekonomicky výhodné. To je důvodem, proč byly větve použity jako matrice pro stanovování flavonoidů.

Pro analyzování flavonoidů z různých zdrojů je možné použít řadu extrakčních, separačních a analytických metod. Extrakci lze provést pomocí klasické Soxhletovi extrakce nebo pomocí rychlejších metod jako např. PSE (pressurized solvent extraction), PHWE (pressurized hot water extraction), extrakce ultrazvukem. Analýzu vzorků lze uskutečnit např. pomocí HPLC (vysoce účinná kapalinová chromatografie) s různými detektory jako třeba DAD (detekce diodovým polem) a UV-VIS (detekce ultrafialovým – viditelným světlem) nebo pomocí MS (hmotnostní spektrometrie) a nebo CZE (kapilární zónová elektroforéza).

Cílem diplomové práce je stanovit množství rutinu a kvercetinu ve vybraných částech bezu černého, listech a větvičkách. Srovnat zjištěné hodnoty s významnými zdroji těchto flavonoidů a posoudit, zda-li je možné bez černý zařadit mezi tyto významné zdroje. Rutin a kvercetin by mohly být využity pro přípravu zdraví prospěšných doplňků stravy.

2 Teoretická část

2.1 Bez černý

Bez černý, latinským názvem *Sambucus nigra* L., patří v České republice mezi všudypřítomné rostliny nenáročné na pěstování. To je také důvod, proč se většinou vyskytuje jako planě rostoucí keř. Jeho domovinou je celá Evropa a dále i Malá Asie, Kavkaz a území sahající až po Sibiř. Jde tedy o mírné až subtropické podnebí, kde tento keř, místy až statný strom, roste. Nachází se na slunných až polostinných místech.

Sambucus nigra L. patří do čeledi *Caprifoliaceae*. Samotný rod *Sambucus* zahrnuje až 40 druhů rostlin. Ne všichni zástupci tohoto rodu mají stejně jako bez černý léčivé účinky využívané hojně již ve středověku, kdy jej lidé aplikovali na různá onemocnění. Z kůry se účinné látky získávaly v podobě odvaru, který se vyznačoval projímavými účinky, a proto byl konzumován při problémech s vyprazdňováním. Z listů se vyráběla tzv. zelená mast nanášená na pohmožděnin a na různé otoky k jejich zklidnění. V dnešní době se pro léčebné účely kůra ani listy neaplikují, protože byla zjištěna přítomnost toxinu sambunigrinu ve větším množství, které může způsobit otravy. Příznaky otravy se projevují průjemem nebo prudkým zvracením.

Květy a plody jsou však stále hojně využívány např. na přípravu čajů, sirupů a likérů, které jsou zdraví prospěšné. Plody jsou také surovinou na přípravu marmelád. Bohužel i v těchto částech byl sambunigrin stanoven, ne však v množství, které by při běžném užívání mohlo způsobit otravy.[1][2]

2.1.1 Vlastnosti

Jak již bylo zmíněno na začátku v kap. 1.1., vyskytuje se bez černý jako keř vysoký asi 1,5 až 5 metrů, ale může dorůstat až do velikosti statného stromu a dosahovat výšky 10 metrů (viz Obr. 1). Jeho dřevo je velmi křehké, duté a lehce opracovatelné, kůra je hladká, zbarvená do tmavě šedé barvy.

Na jaře tuto léčivou rostlinu poznáme převážně podle smetanově bílých květů uspořádaných do složeného okolíku (viz Obr. 2). Mají velmi výraznou a trochu nepříjemnou vůni, která se po usušení zjemní a stává se příjemnou. Většinou se celé okolíky sbírají v červnu a červenci a využívají se na přípravu různých surovin, např. sirupů a čajů. Po jejich odkvetení dozrají bobulovité peckovice černofialové barvy (viz Obr. 3). Jsou jedlé a mají příjemnou vůni. Lidé je využívají na přípravu oblíbených likérů, do kterých přidávají trochu alkoholu, čímž se znásobí analgetické účinky plodů. [1]

Listy bezu černého jsou vstřícně řapíkaté a lichozpeřené se 3 až 7 lístky. Na okraji jsou pilovité a na vrcholu špičaté. [2]



Obr. 1 Keř bezu černého (Sambucus nigra L.) [3]



Obr. 2 Květenství bezu černého – složený okolík [4]



Obr. 3 Plody černého bezu – bobulovité peckovice [4]

2.1.2 Léčivé účinky

Černý bez je univerzální léčivá rostlina. Svou léčivou funkci mají jak květy a plody, tak i listy a kůra. Každá z těchto částí byla používána na specifická onemocnění. Zřejmě z tohoto důvodu platí staré přísloví „Před heřmánkem smekni – před bezinkou klekni“.

Květy se používají na stimulaci krevního oběhu, působí antikatarálně, potopudně a protizánětlivě. Proto se hojně využívají na léčbu horečnatých onemocnění proti nachlazení a proti chřipce.[5] Květní droga se dá používat i k přípravě různých obkladů nebo tinktur k léčení chorob dutiny ústní, k inhalaci při rýmě, zánětech průdušek, bolestech hlavy a uší nebo jako obklad na křečové žíly. V květech jsou obsaženy flavonoidy (hlavně rutin viz kapitola 2.2.5), trísloviny, glykosid sambunigrin (jedovatý), organické kyseliny, cholin, cukry, malé množství silice a vitamín C. [6]

Plody jsou též potopudné, navíc i diuretické a projímavé. Jejich hlavní předností je vysoký obsah různých vitamínů důležitých pro lidské zdraví, jedná se o vitamíny C, B1, B2, B6, B12. [5] V plodech jsou obsaženy stejné látky jako v květech. Samozřejmě mají plody i některé látky navíc jako např. anthokyanová barviva, cukr, pektín, pryskyřice či kyselinu panthotenovou.[6] V lidovém léčitelství je zmíněn analgetický účinek plodů bezu černého pomáhající proti migréně, neuralgii a při bolesti trojklaného nervu, páteře nebo kloubů. Lze je také použít při křečích trávicího ústrojí a při nadýmání. [2]

Listy se používaly na výrobu „zelené masti“, která měla hojivé účinky na pohmožděniny, rány, výrony a hemeroidy. Své využití měla v minulosti i kůra při zácpě a artritidě, jelikož má zahřívací účinky a je silně projímavá. Je také účinná jako jaterní stimulant. [5]

Dnes jsou běžně využívány pouze květy a plody k přípravě různých sirupů, likérů, čajů atd., protože při používání listů a kůry k přípravě léčivých prostředků se zjistily časté negativní účinky způsobené otravou toxinem sambunigrinem, který je v těchto částech rostliny obsažen. Jak bylo zmíněno výše, sambunigrin je obsažen v malém množství

i v květenství. Ve zralých plodech dosud přítomnost toxického sambunigrinu prokázána nebyla. [6]

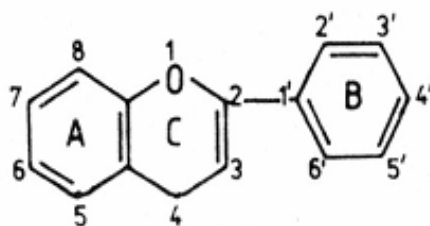
Bez černý samozřejmě není využíván pouze v domácnostech a v lidovém léčitelství. Slouží také jako zdroj surovin na výrobu různých lektvarů, šťáv i vína v potravinářském průmyslu. [6]

Tato rostlina má tedy velmi širokou škálu léčebných účinků a předpokládá se, že za většinu z nich vděčí přítomnosti flavonoidů.

2.2 Flavonoidy

2.2.1 Struktura

Flavonoidy jsou sloučeniny skládající se z 15 uhlíkaté kostry tvořené dvěma fenylovými kruhy spojenými tříuhlíkatým můstkem (viz Obr. 4.). Jde o deriváty difenylpropanu vznikající jako sekundární metabolity převážně u rostlin. V roce 1936 byly identifikovány první flavonoidy a doposud již bylo nalezeno v přírodě přes 4000 různých druhů. Jejich biosyntézy jsou obecně schopné pouze rostliny, živočichové a houby nikoli. Existuje však několik výjimek jako např. mořský korál *Echinophora lamellosa* a vláknité houby *Aspergillus candidus* a *Phallus impudicus*.



Obr. 4 Flavanový skelet [7]

V rostlinách se flavonoidy vyskytují v řadě druhů jako anthokyanidiny, flavony, flavonoly, flavanony, katechiny, dihydroflavonoly, chalkony, aurony, flavany, proantokyanidiny, isoflavonoidy, biflavonoidy atd. Běžně se tyto sloučeniny neobjevují samostatně, ale mají navázanou nějakou substituční skupinu - hydroxylovou, methoxylovou, methylovou nebo glykosilovou. Občas se k flavonoidovému jádru a jejich glykosidům připojují ještě navíc aromatické nebo alifatické kyseliny, sulfáty, methylenedioxy nebo isoprenové skupiny. V podobě těchto složitých molekul je můžeme najít ve všech částech rostlin (v kořenech, listech, květech i stonku). Flavonoidové aglykony byly dokonce zjištěné v podobě vosku na listech, kůře, pupenech a nebo jako krystalky v buňkách kaktusů. [8][9]

2.2.2 Význam

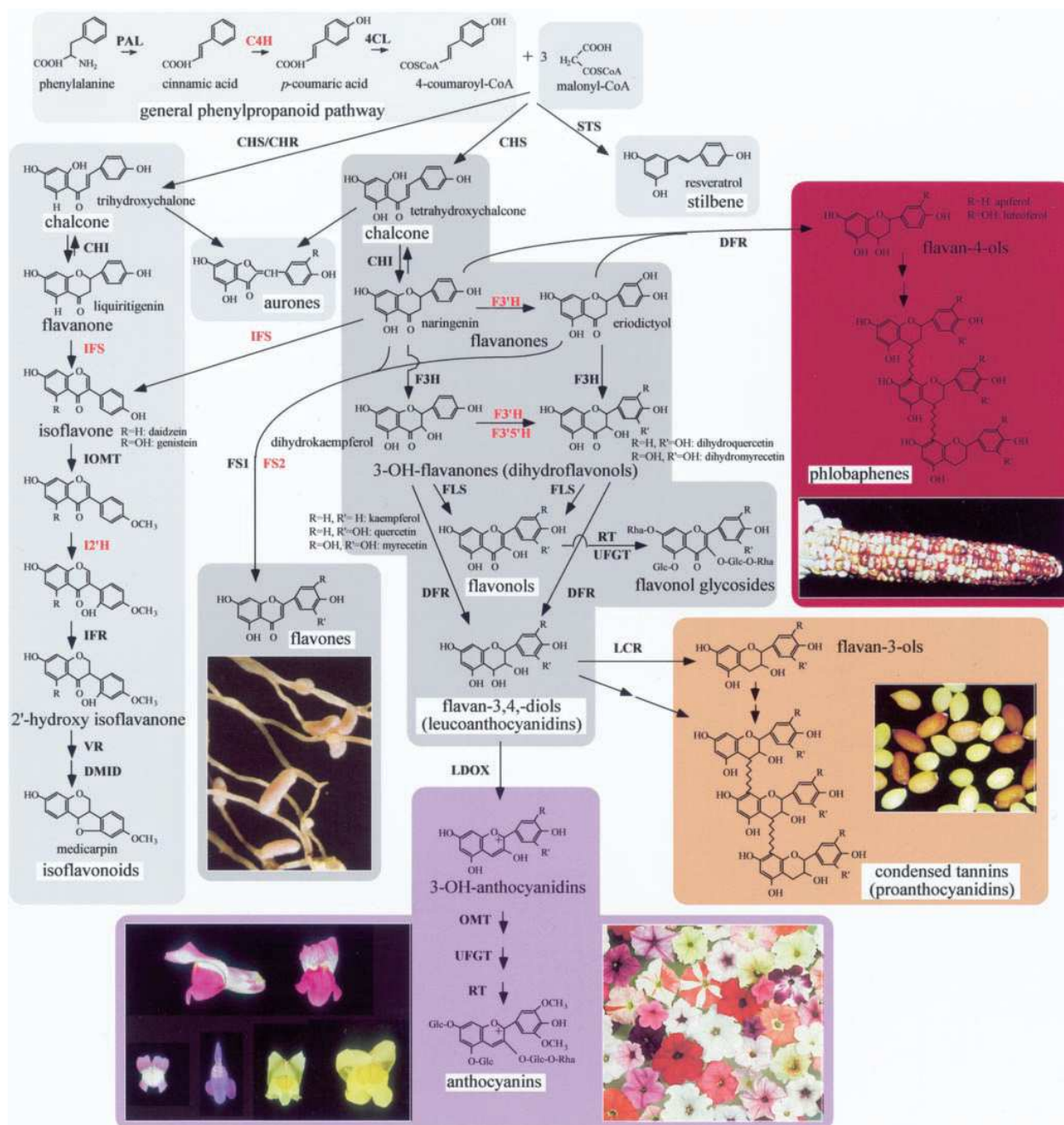
Flavonoidy jako hlavní červené, modré a purpurové pigmenty rostlin poskytují nádhernou barevnost květů, ovoce, semen, listů a díky tomu hrají klíčové role v signalizaci mezi rostlinami a mikroby, v mužské fertilitě některých druhů či v ochraně proti škůdcům.

Působí tedy jako antimikrobiální agenty a tzv. „krmící detergenty“ zabraňující nežádoucímu ožírání rostlin. Poskytují také UV ochranu.[10]

Mezi přírodní zdroje flavonoidů pro lidskou výživu patří zelenina a ovoce. Díky jejich farmakologickým a biochemickým účinkům je stále vyšší zájem o příjem těchto sloučenin. Flavonoidy jsou považovány za protirakovinné látky, protože se jedná o silné antioxidanty a tzv. „zachytávače“ volných radikálů (právě volné radikály jsou v organismu hlavní příčinou vzniku nádorových onemocnění). Do skupiny antioxidantů patří například i vitamíny C a E, u kterých přítomnost flavonoidů vyvolává zvýšený antioxidační účinek, působí spolu synergicky.[8][9]

Kromě vychytávání volných radikálů, aktivace antioxidačních enzymů a inhibice oxidáz jsou flavonoidy schopné vázat do komplexů ionty přechodných kovů. Tím mění jejich dostupnost jako katalyzátorů v oxidačně-redukčních reakcích. Daným sloučeninám jsou připisovány i další farmakologicky významné účinky, jako např. protizánětlivé, protibakteriální, antivirové, antialergické a antitrombotické – zabraňující shluku krevních destiček. Flavonoidy také uvolňují hladké svalstvo a snižují permeabilitu buněčných membrán u kapilár.[7]

2.2.3 Biosyntéza



Obr. 5 Základní větve syntézy flavonoidů: CHS – chalkon syntéza; C4H-cinnamate4-hydroxyláza; CHI-chalkon izomeráza; CHR-chalkon reduktáza; CHS-chalkon syntáza; 4CL-4-koumaroyl:CoA-ligáza; DFR-dihydroflavonol 4-reduktáza; DMID-7,2'-dihydroxy, 4'-methoxyisoflavanol dehydratáza; F3H-flavanon 3-hydroxyláza; FSI a FSII-flakon syntéza; F3'H-flavonoid 3'hydroxyláza nebo flavonoid 3'5'hydroxyláza; IOMT-O-methyltransferáza; IFR-isoflavon reduktáza; I2'H-isoflavon 2'-hydroxyláza; IFS-isoflavon syntéza; LDOX-leukoantokyanidin dioxygenýza; LCR-leokoantokyanidin reduktáza; OMT-O-methyltransferáza; RT-rhamnosyl transferáza; STS-stilben syntéza; UFGT-UDPG-flavonoid glukosy transferáza a VR-vestiton reduktáza [10]

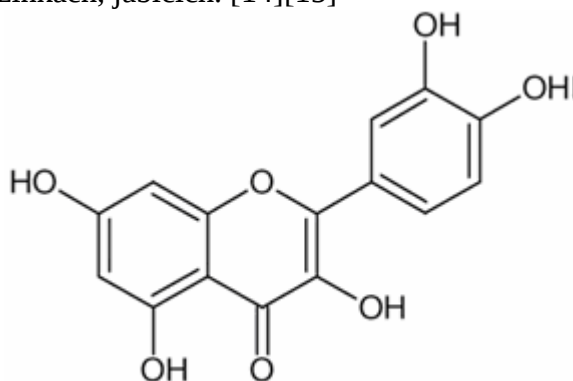
Na Obr. 5 jsou schematicky znázorněny hlavní větve biosyntézy flavonoidů, která začíná fenyylpropanoidovým metabolismem a dále se rozvětňuje za vzniku devíti různých podskupin. Tyto podskupiny jsou barevně rozlišené. V šedých rámečcích jsou umístěné chalkony, aurony, isoflavonoidy, flavony, flavonoly a flavandioly. V barevných rámečcích jsou vidět anthokyaniny, kondenzované tanniny a flobafenové pigmenty. Biosyntéza se realizuje díky přítomnosti různých enzymů (viz Obr. 5) katalizujících dílčí reakce.

Následující část se bude zabývat pouze flavonoidy kvercetinem a rutinem. Tyto sloučeniny budou extrahovány z kůry bezu černého a kvantitativně stanovovány pomocí HPLC. Jsou to látky s významnými farmakologickými účinky. [10]

2.2.4 Kvercetin

2.2.4.1 Chemická struktura a přírodní zdroje

Kvercetin je jedním z nejvíce se vyskytujících flavonoidů v zelenině a ovoci, kde se nachází často v podobě glykosidů nebo aglykonů. V nich je vázána jedna nebo více sacharidických skupin na fenolickou skupinu pomocí glykosidické vazby. Nejčastěji jde o glukózu, ale ve flavonoidech nalezneme i galaktózu, rhamnózu a další. Kvercetinové glykosidy obsahují sacharidické skupiny nejčastěji vázané ve třetí poloze (výjimkou je cibule, která je největším zdrojem kvercetinu). V přírodě je popsáno skoro 180 různých glykosidů kvercetinu vyskytujících se např. jako kvercetin-4'-glykosid v cibuli, kvercetin-3-rutinosid (rutin viz. kap. 2.2.5) v rajčatech a kvercetin-3-galaktosid v jablcích. [11][12]. Největší množství kvercetinu bylo stanovené v červené cibuli 45 ± 21 mg/100g, žluté cibuli 34 ± 7 mg/100 g, brusinkách 21 mg/100 g a kapustě 12 ± 2 mg/100 g.[13] Jiné studie zabývající se množstvím různých flavonoidů v ovoci a zelenině zjistily významné množství kvercetinu např. v cherry rajčatech, hlávkovém salátě, pažitce, červených hroznech, černém rybízu, brokolici, borůvkách, bezinkách, jablcích. [14][15]



Kvercetin

2.2.4.2 Farmakologické účinky

Flavonol kvercetin patří mezi fytochemikálie, což jsou látky rostlinného původu, které vykazují ochranné nebo preventivní vlastnosti proti různým onemocněním. [16] Kvercetin se

vyznačuje mnoha zdraví prospěšnými účinky zahrnujícími zlepšení kardiovaskulárního systému, snížení nebezpečí rakoviny a ochranu proti osteoporóze. Má protizánětlivé, antialergické a antioxidační účinky. Jedná se o silný antioxidant, který je schopný vázat do komplexů kovy (tvořit cheláty), vychytávat volné radikály kyslíku a zabraňovat oxidaci LDL (low density lipoprotein) in vitro. Kvercetin dále ovlivňuje expresi specifických enzymů, navozuje apoptózu a má vliv na signální cesty proteinkinázy a lipidkinázy. [17][18]

Velmi významná je jeho schopnost tlumit alergické reakce, protože brání uvolňování histaminu z buněk (stejně jako lék proti alergiím cromolyn, který má velmi podobnou chemickou strukturu). Kvercetin také redukuje hladinu glukózy v krvi a zlepšuje hladinu inzulinu. Proto je vhodnou prevencí proti nemocem spojeným s obezitou, k léčbě kardiovaskulárních onemocnění u pacientů s Diabetes mellitus nebo pacientů trpících určitými dýchacími obtížemi. Bylo zjištěno zlepšení funkce plic a snížení rizika např. astmatu nebo bronchitidy u lidí s vysokým příjmem jablek, která jsou bohatá na kvercetin. [17][18]

Další studie ukazují, že kvercetin redukuje riziko rakoviny prostaty, vaječníku, prsu, žaludečních a střevních buněk. Je považován za jednu z nejsilnějších protirakovinných látek. In vitro byla zjištěna schopnost kvercetinu způsobit apoptózu rakovinných buněk přes různé mechanismy. [17][18]

2.2.4.3 Absorpce v organismu

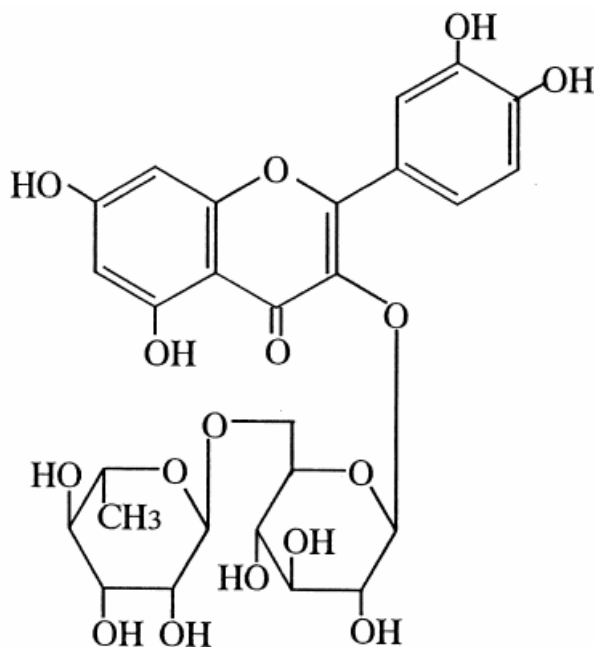
I přes významné benefity pro lidi, kteří konzumují vyšší množství kvercetinu v potravě, existuje stále nejistota týkající se vstřebávání významného antioxidantu v lidském organismu. Farmakokinetická data zabývající se daným problémem jsou velmi vzácná a často i protichůdná. Důvodem proč se vědci domnívaly, že k vstřebávání v lidském organismu nedochází, byla odolnost L-glykosidické vazby mezi sacharidem a flavonolem proti hydrolýze pankreatickými enzymy. Avšak při studiích zabývajících se měřením fekálního kvercetinu, bylo zjištěno, že k absorpci v organismu dochází. Bylo zjištěno vstřebávání kvercetin-L-glykosidu z cibule 52 %. Za stejných podmínek byla absorpce kvercetinu bez cukerných zbytků (aglykony) a kvercetin-L-rutinosidu okolo 20 %. Tyto výsledky ukazují vliv cukerných zbytků na vstřebávání kvercetinu v lidském organismu. [19]

2.2.5 Rutin

2.2.5.1 Chemická struktura a přírodní zdroje

Rutin nebo-li kvercetin-3-rutinosid je flavonoidem flavonového typu. Skládá se z flavonoidu kvercetinu, na který je ve třetí pozici navázán disacharid rutinóza. Rutinóza se skládá z rhamnózy a glukózy. Tento flavonol se vyskytuje stejně jako ostatní flavonoidy v rostlinách a jeho hlavním zdrojem je pohanka, jablka, černý čaj a další. [20] Množství rutinu v rostlinách je velmi závislé na UV záření. Čím je více UV záření, tím více rutinu se nachází v daných rostlinných zdrojích. [21] Ke srovnávání množství rutinu dochází i přímo mezi určitými druhy rostlin. Bylo srovnáváno i množství rutinu v různých druzích pohanky. Největší množství rutinu, 81 g/kg, bylo stanoveno v *Fagopyrum tartaricum* (L) Gaertn nebo-li „tartary“ pohance, což je asi 300krát více než bylo v běžném druhu pohanky [22] Jiní vědci zjišťovali rozdíly v množství rutinu v určitých částech pohanky (*Fagopyrum esculentum* Moench). Docházelo ke srovnávání obsahu rutinu v nudlích vyrobených z pohanky, v tmavé

mouce a v mouce z listů pohanky. Nejvíce rutinu (celých 2700 mg/kg suché váhy) bylo obsaženo v mouce z listů. V tmavé mouce se množství pohybovalo okolo 218 mg/kg. [23] K nejvýznamnějším zdrojům rutinu patří (jak už bylo zmíněno) pohanka, dále pak chřest, slupky rajčat a jablek, broskve, nektarinky, lesní plody, kiwi, banány, výluh zeleného a černého čaje atd. [24]



Rutin (kvercetin – 3 – rutinosid)

2.2.5.2 Biologická a farmakologická aktivita

Rutin, podobně jako kvercetin, vykazuje protizánětlivé, antioxidační, protialergické a protikarcinogenní účinky. Je známý svou antitrombotickou aktivitou, chrání buňky i cévy pomocí zvyšující se síly kapilár a redukcí jejich permeability. Rutin se používá jako doplněk stravy kvůli prevenci krvácení a praskání v kapilárách i pojivové tkáni. Dále je důležitý při léčení chronického cévního selhání, krvácení a epitaxy. [20] Jako antioxidant má rutin schopnost vychytávat OH radikály, superoxidové radikály a peroxy radikály. Kromě toho také působí proti bakteriím a virům. Je schopný stabilizace vitamínu C, čímž podporuje jeho aktivitu. [25][26] Rutin má oblasti využití i mimo farmaceutický průmysl. Je používán jako přírodní pigment, antioxidant, stabilizátor, potravinový konzervační prostředek a UV absorbent v potravinách, krmivech pro zvířata, kosmetice a chemickém průmyslu. [27] Nevýhodou molekuly rutinu je jeho slabá rozpustnost ve vodných médiích, a to je důvodem jeho horší přírodní dostupnosti. [25]

2.3 PSE – *pressurized solvent extraction*

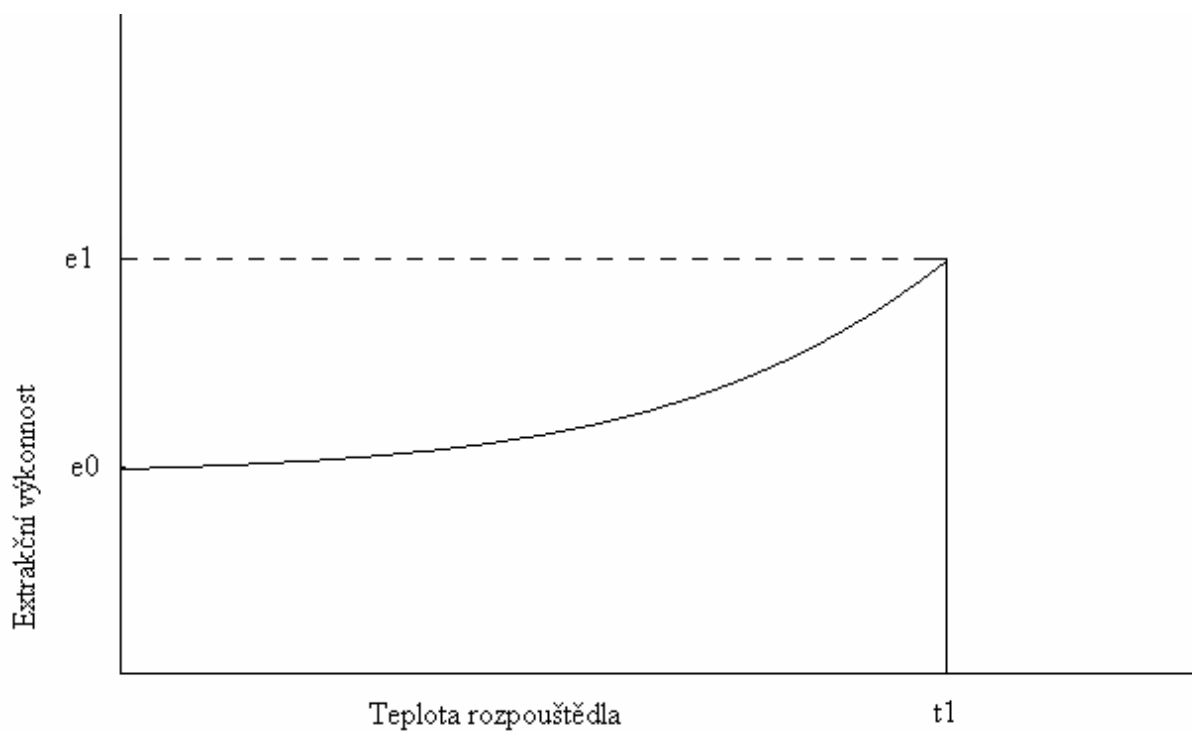
Technika PSE je známá od roku 1996, kdy se začala hojně využívat v různých oblastech výzkumu a začala nahrazovat tradiční extrakční techniky. PSE, z anglického *pressurized solvent extraction*, je extrakce rozpouštědlem za zvýšeného tlaku a teploty, proto se řadí do skupiny extrakcí kapalinou společně např. se Soxhletovou extrakcí, se kterou je často i srovnávána. V literatuře můžeme najít tuto techniku pod různými názvy jako je zrychlená extrakce rozpouštědlem (ASE), kapalinová extrakce za zvýšeného tlaku (PFE), tlaková kapalinová extrakce (PLE), tlaková extrakce horkým rozpouštědlem (PHSE), extrakce rozpouštědlem za vysokého tlaku (HPSE), extrakce rozpouštědlem za zvýšeného tlaku a teploty (HPHTSE) a subkritická extrakce rozpouštědlem (SSE). [28]

PSE extrakční metoda byla společností EPA vyvinuta a potvrzena jako využitelný, automatický extrakční systém a pojmenována jako EPA metoda 3545. Byla potvrzena pro extrakci vzorku z pevných matric, proto se používá na získávání látek nerozpustných nebo částečně rozpustných ve vodě, jako jsou některé těkavé organické sloučeniny solí, jílů, sedimentů, bláta a pevných nečistot. [28]

2.3.1 Princip metody

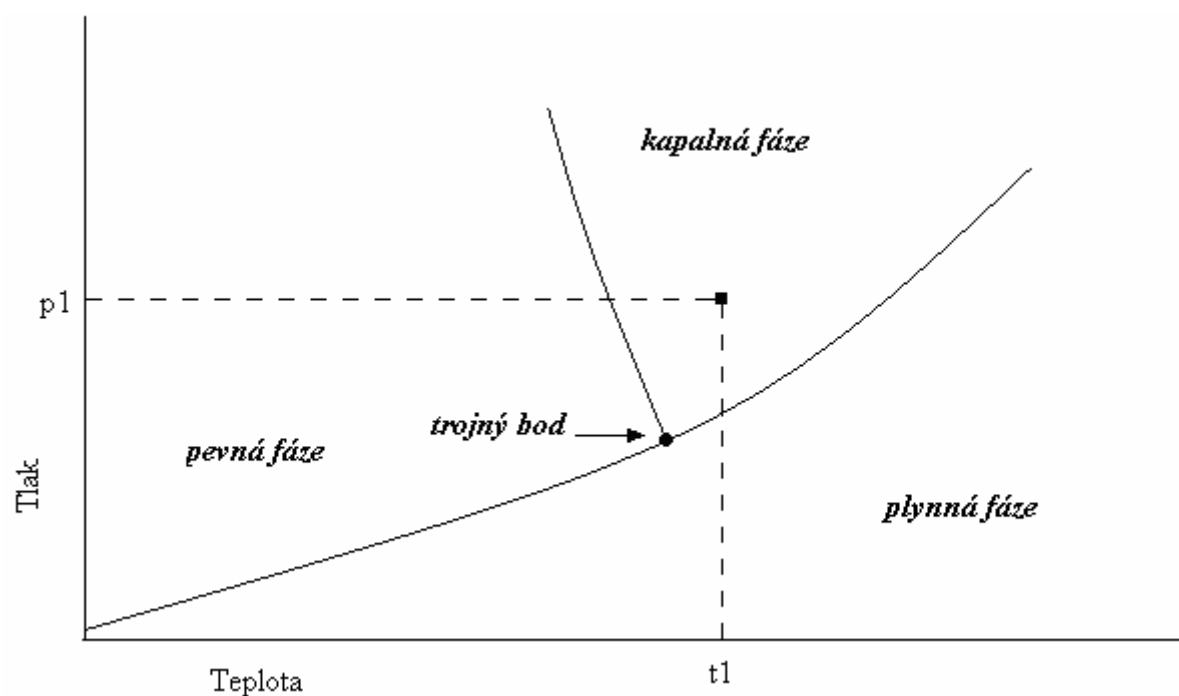
Principem metody je zvýšení extrakční kinetiky pomocí zvýšené teploty organického rozpouštědla, k čemuž potřebujeme zvýšený tlak, aby se rozpouštědlo udrželo v kapalném stavu a nepřecházelo do stavu plynného. Při přechodu rozpouštědla do plynného stavu klesá extrakční výkonnost na nulu, což je nežádoucí. Používá se v technice PSE rozpouštědlo o vyšší teplotě, protože čím vyšší teplotu kapalina má, tím větší má solvatační účinnost nebo-li rozpouštěcí schopnost.

V tradičních metodách bez působení tlaku na extrakční rozpouštědlo dosahuje extrakční výkonnost určitého maxima, což odpovídá bodu varu rozpouštědla. Při dosažení bodu varu se rozpouštědlo mění v plyn a extrakční účinnost klesá na nulu, což je znázorněné na grafu závislosti extrakční výkonnosti na teplotě rozpouštědla, kde *t_l* je teplota varu rozpouštědla (viz Obr. 6). [28]



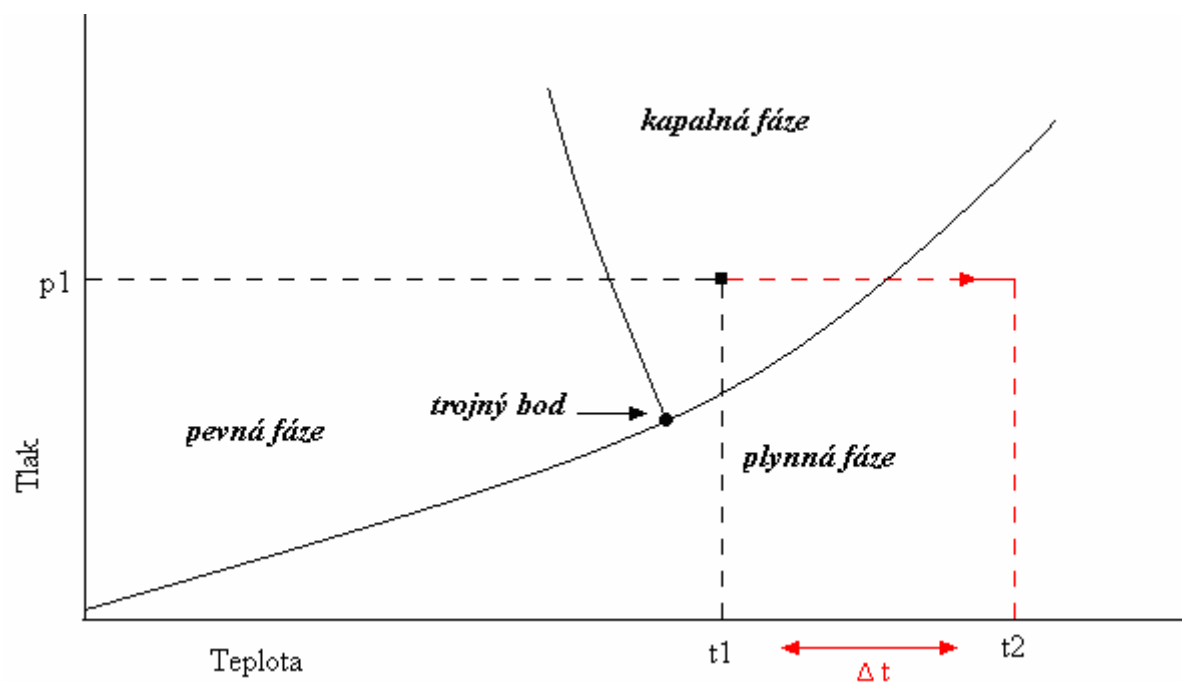
Obr. 6 Graf závislosti extrakční výkonnosti na teplotě rozpouštědla, křivka extrakční výkonnosti bez použití techniky PSE [28]

Jakým způsobem je závislá teplota na tlaku je ukázáno na trojfázovém diagramu na Obr. 7, 8 a 9. Na prvním z nich je vidět trojfázový diagram, v něm je bod znázorňující látku v kapalném stavu při určitém tlaku **p_1** a teplotě **t_1** .

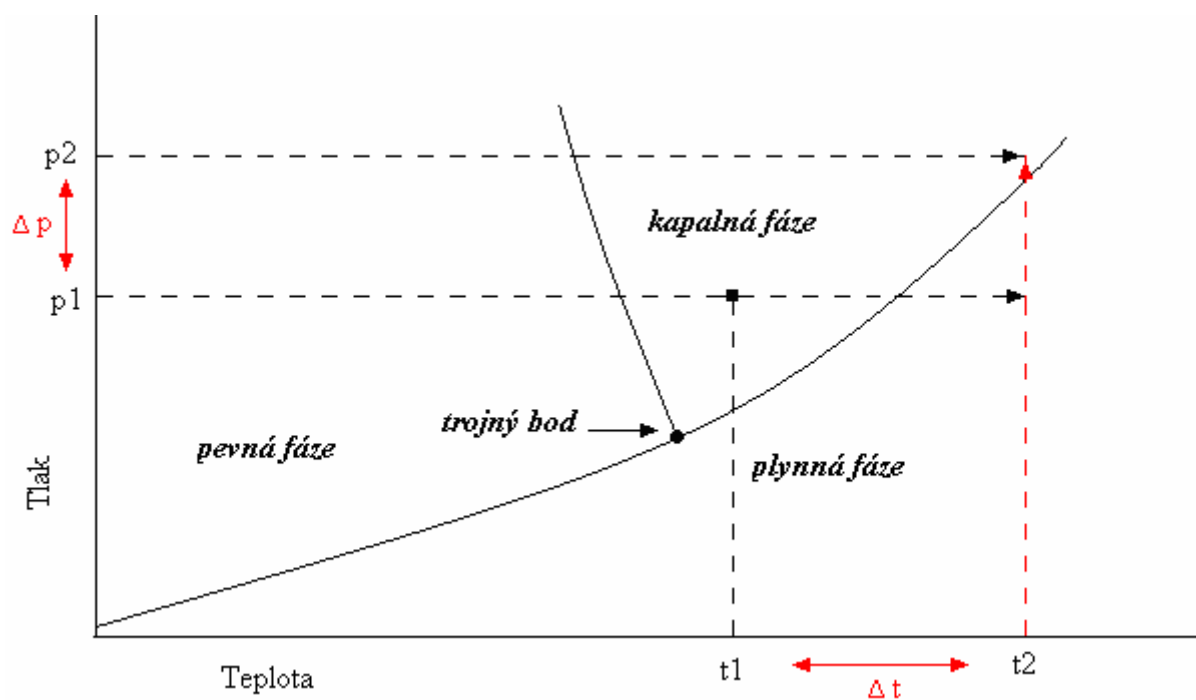


Obr. 7 Trojfázový diagram, zakreslena látka v kapalném stavu [28]

Při zahřívání dané látky v kapalném stavu se její teplota zvyšuje, až dosáhne teploty varu, což v trojfázovém grafu znázorňuje křivka oddělující kapalinu a plyn. Po překročení této hodnoty teploty se kapalina mění na plyn (viz Obr. 8), a to jak už bylo zmíněné výše není při extrakci žádoucí. Z tohoto důvodu je potřeba zvýšit tlak působící na danou látku, aby se změnila opět z plynného stavu na kapalný. Tuto změnu znázorňuje Obr. 9.

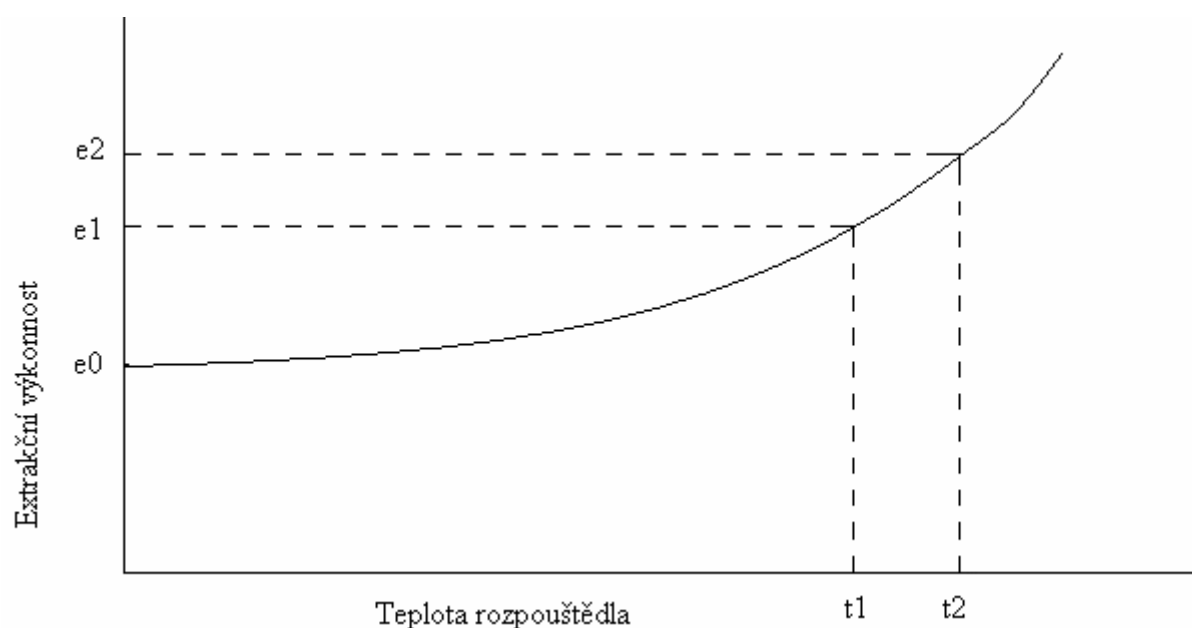


Obr. 8 Trojfázový diagram, zvyšování teploty látky z t_1 na t_2 [28]



Obr. 9 Trojfázový diagram, zvyšování tlaku působícího na látku z p_1 na p_2 [28]

U metody PLE vypadá graf závislosti extrakční výkonnosti na teplotě rozpouštědla poněkud jinak a to právě díky působení vyšších tlaků na rozpouštědla. Rozpouštědlo je napumpováno do extrakčních nádob naplněných vzorkem, je zahřáté a udržované pod tlakem, tím urychluje extrakční proces a zvyšuje rozpustnost analytu v rozpouštědle. Dochází k lepšímu pronikání rozpouštědla do matrice vzorku. Tím se také zvyšuje kinetická rychlost desorpce analytu z matrice vzorku. Celkově tedy extrakční výkonnost stoupá se zvyšující se teplotou varu rozpouštědla. Tato závislost je znázorněna na Obr. 10. [28]



Obr. 10 Závislost extrakční výkonnosti na teplotě extrakční výkonnost s použitím PSE [28]

2.3.2 One PSE a Fast PSE

Systém PSE je automatizovaný a je vyroben ve dvou možných provedeních. Prvním z nich, jak už je poznat z názvu, byl One PSE, který zpracovává pouze jeden vzorek v daném extrakčním cyklu. Naopak později na zakázku vyrobený Fast PSE měl umožnit rychlejší výzkum pomocí této techniky. [28]

2.3.2.1 One PSE [28]

Jak už bylo zmíněno, jedná se o přístroj, který byl používán a sestavený jako první pro extrakci založenou na principu PSE. Je automatizovaný a schopný extrakce pouze jednoho vzorku v daném cyklu. U One PSE je komora pro vkládání vzorku seshora, což je vidět na Obr. 11. Na přední straně je umístěný hlavní panel s nabídkou naprogramovaných metod, ze kterých si zvolíme tu, která je pro danou extrahovanou látku nejvhodnější.



Obr. 11 Přístroj One PSE - rozměry – šířka 31,75 cm, výška 48,90 cm a tloušťka 45,09 cm

Extrakce na přístroji je jednoduchá. Do nerezových ocelových nádob (patron) se připraví vzorek matrice. Patrony jsou v různých velikostech 11, 22, 33 až 40 ml. Vzorkem naplněná patrona se následně vloží do přístroje, na jehož přístrojové desce je navolena jedna z přednastavených metod extrakce. Samozřejmě musí být v zásobníku přístroji potřebné rozpouštědlo a nádobka, do které je shromažďovaná vyextrahovaná látka. Těmto nádobkám se říká vialky (převzato z angličtiny). Jsou běžně ve velikostech od 40 do 60 ml. Po spuštění přístroje se mohou připravovat další vzorky zatímco přístroj běží. Doba extrakce se běžně pohybuje okolo 10 minut, ale může trvat od 1 až po 99 minut.

Kapalina je do komůrky se vzorkem dávkována pomocí vysoce účinné pumpy, která je schopná dosáhnout tlaku až 15 MPa, tok rozpouštědla je typicky 10 ml/min. Samozřejmě je potřeba zahřívání okolí vzorku, takže extrakčním modulem je pec, která je schopna dosáhnout teploty od 50 do 200 °C.

Velmi důležitou roli hraje přečištění vzorku před extrakcí, které se provádí pomocí inertního plynu, např. dusíku. Tento plyn musí být natlakovaný a přečištěný, odstraňuje ze vzorku zbytky kyslíku, které by mohly ovlivňovat průběh metody.

Samotné extrakci předchází mnohem složitější krok, a tím je nalezení nejúčinnějšího způsobu extrakce, tedy optimalizace metody, což zahrnuje nalezení vhodného extrakčního rozpouštědla, zvolení si vhodné teploty extrakce, velikosti tlaku a doby působení rozpouštědla na matici.

2.3.2.2 Fast PSE [28]

Vylepšený přístroj Fast PSE (viz Obr. 12) byl sestavený na zakázku, aby metoda extrakce byla ještě o krok dále. Dochází k rychlejšímu výzkumu díky této metodě, protože se může naráz extrahovat až 6 vzorků a je možné použít až 4 různá rozpouštědla.

Při extrakci se vloží 6 nerezových nádob naplněných vzorkem a 6 vialek na extrakt. Metoda se nastaví stejně jako u one PSE z hlavního panelu na přístroji nebo je vybrána z nabídky na připojeném stolním počítači. Přístroj je schopný zaznamenávat data i ukládat nové metody do své paměti. Extrakční nádobky mají velký vnitřní průměr pro snadné plnění

matricí. Stejně jako One PSE je přístroj přizpůsobivý a jsou používána rozpouštědla již dříve aplikovaná v tradičních metodách.



Obr. 12 Fast PSE, rozměry - šířka 63,5 cm, výška 67,3 cm a tloušťka 43,2 cm

Velký rozdíl oproti One PSE je v dávkovači rozpouštědla, protože u Fast PSE je možnost nadávkovat až 4 rozpouštědla, která se automaticky rozdělí do extrakčních nádob. Pořadí a množství rozpouštědla se stává součástí aplikace, která se ukládá do mikroprocesoru nebo přímo do připojeného počítače. Díky programovému vybavení v počítači je možné v reálném čase sledovat průběh extrakce, operace pumpy, stav každé pozice ventilu, teplotu zahřátých nádob a individuální tlak v každé z 6 nádob.

Přístroj je vybavený slyšitelným alarmem s automatickým zastavením chodu přístroje. Alarm upozorní pracovníka na nežádoucí situaci, jako je chybějící nádobka v zásobníku na vzorky, chybějící vialka na sběr extraktů, únik rozpouštědla do ovzduší nebo proděravěné nádoby.

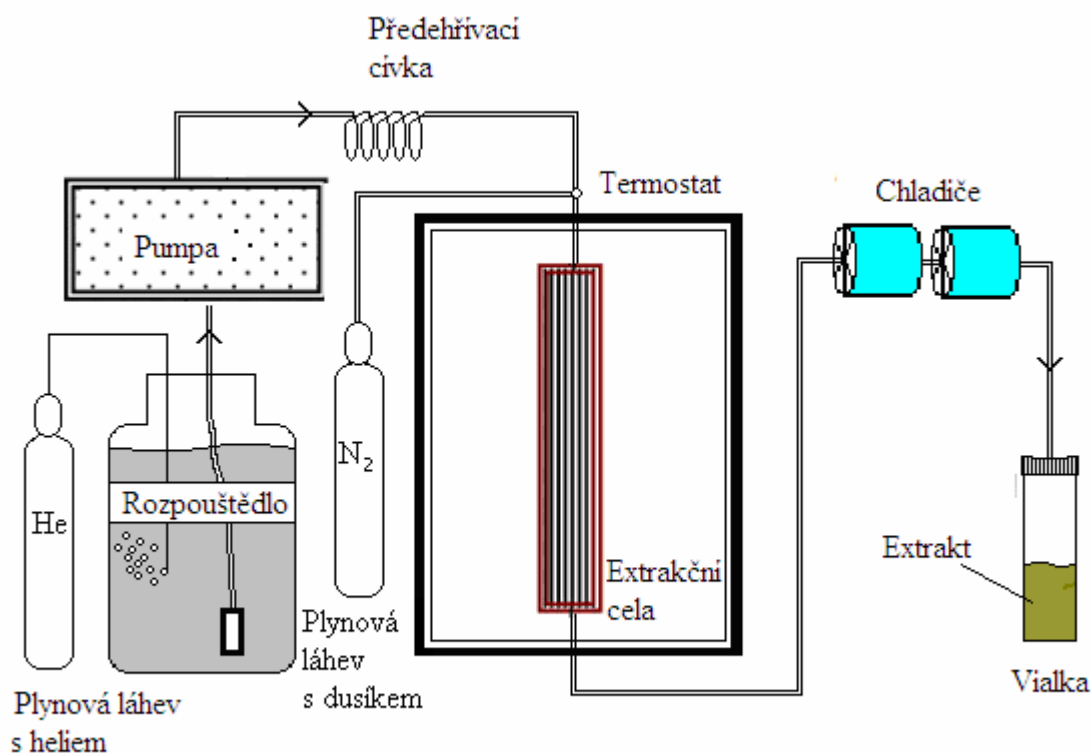
Pro správnou práci na přístroji je potřeba i další příslušenství, jako je nejméně 18 kusů nerezových ocelových nádobek na vzorek, stejný počet vialek a police na přenos extraktů do laboratoří pro další analýzu.

2.4 PHWE – extrakce horkou vodou za zvýšeného tlaku

Metoda PHWE (viz Obr. 13) je principiálně podobná extrakci pomocí PSE. Hlavní rozdíl je v používaném extrakčním rozpouštědle. Jak už napovídá název, u extrakce pomocí techniky PHWE se látky z matrice eluují vodou, která má velmi rozdílné vlastnosti oproti organickým rozpouštědlům používaným v PSE. Voda má vysokou dielektrickou konstantu při pokojové teplotě a atmosferickém tlaku, a to je důvodem, proč nebyla považována za vhodné extrakční rozpouštědlo. Když je zvýšená teplota vody, dojde k poklesu její permeability, viskozity, povrchového napětí, a tím k růstu její schopnosti pronikat do matrice. [29]

Extrakční mechanismus uskutečňující se uvnitř extrakční nádoby naplněné materiálem vzorku může být rozdělený do 4 kroků [29]:

- 1) desorpce látek z různých aktivních míst v matrixu vzorku pod zvýšeným tlakem a teplotou
- 2) difúze extrakční kapaliny do matrixu
- 3) v závislosti na matrixu se látky vzájemně rozdělí mezi matrix vzorku a extrakční kapalinu
- 4) látky jsou eluovány z extrakční nádoby do kolekce vialek



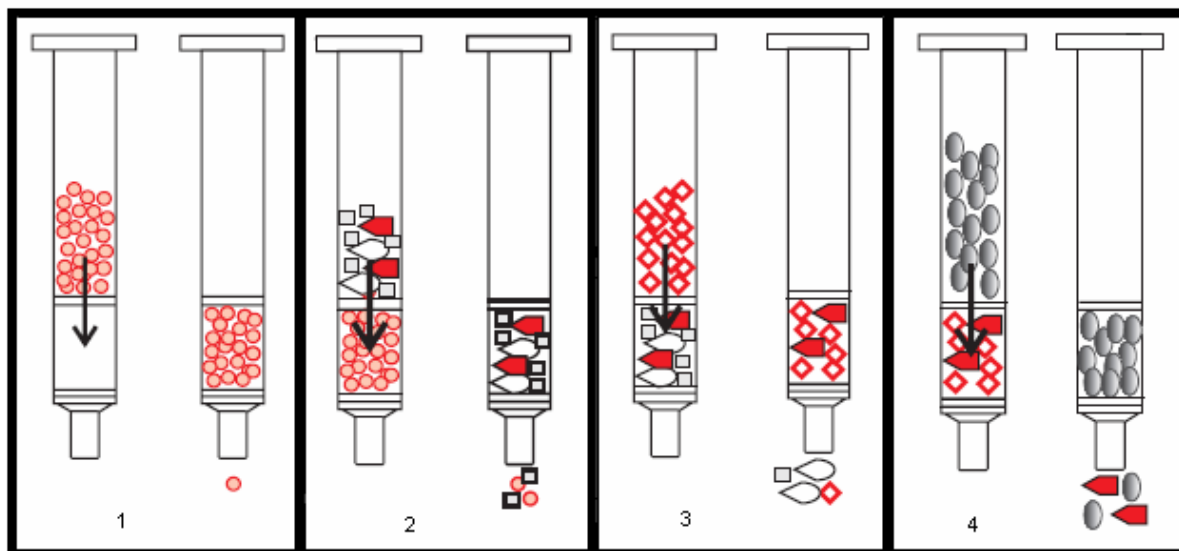
Obr. 13 Instrumentace PHWE

2.5 SPE – solid phase extraction (extrakce pevnou fází)

Extrakce pevnou fází je dostupná preparativní technika pro přípravu vzorků. Principem SPE je zachycení látek na sorbent umístěný v SPE kolonce při průtoku vzorku kolonkou. Existují dvě možnosti preparace vzorku pomocí SPE kolonek. V prvním případě se na kolonce zachytí látky ze vzorku pro stanovení, balastní látky projdou kolonkou bez zadržení, poté jsou do čisté zkumavky eluovány zachycené látky. Druhou možností je zachycení balastních látek na pevné fázi. Látky pro stanovení tak projdou kolonkou a jsou zachycovány do zkumavky. [30]

SPE kolonky se rozdělují podle použité pevné fáze na SPE na reverzní fázi, SPE na normální fázi, SPE iontově výměnné a SPE adsorpční. Většinou jsou používány na úpravu kapalných vzorků, extrakci částečně těkavých a netěkavých analytů. Dají se ale použít i na úpravu pevné matrice, která je předextrahována v rozpouštědle.

Postup při úpravě vzorků pomocí SPE kolonky je znázorněn na Obr. 14. V první řadě se vybere SPE kolonka se sorbentem vhodným pro úpravu vzorku, který je analyzován. Poté se kolonka musí kondicionovat vhodným rozpouštědlem, a tím dojde k tzv. aktivaci skupin navázaných na povrchu sorbentu. Po aktivaci je nadávkován vzorek, jsou vymyty balastní látky a nakonec jsou do čisté zkumavky eluovány zachycené látky. [30]

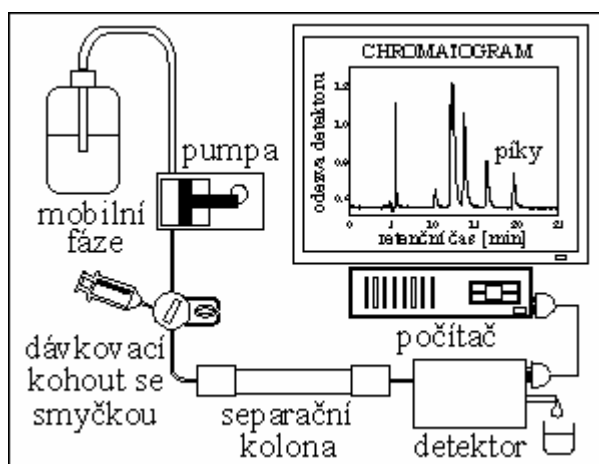


Obr. 14 Postup pro úpravu vzorků, 1-kondicionování kolonky, 2-nadávkování vzorku, 3-promytí kolonky, 4-eluce látek [30]

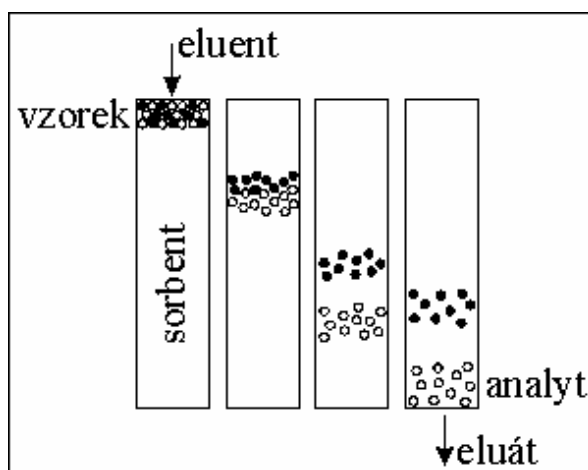
2.6 HPLC Flavonoidů

2.6.1 Princip vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC)

Vysoce účinná kapalinová chromatografie (viz Obr. 15) se používá převážně pro dělení polárních a vysokomolekulárních organických látek. Používá se kapalina jako mobilní fáze, eluent. Stacionární fází je pevná látka nebo-li sorbent, který je uspořádaný do trubice (kolony). Vzorek se dávkuje pomocí mikropipety do dávkovací smyčky s kohoutem, odkud je potom unášen mobilní fází na povrch stacionární fáze a dále prochází přes kolonu. V koloně dochází k rozdělení látek (viz Obr. 16) ve vzorku na základě interakcí se sorbetem. Ve většině případů se používá technika chromatografie na obrácené fázi (reversní fázi), kde je mobilní fáze polární a stacionární fáze nepolární. Také se používá chromatografie na normální fázi, kde je naopak stacionární fáze polární a mobilní fáze nepolární. [31][32]



Obr. 15 Instrumentace HPLC [33]



Obr. 16 Náskres separace látek při průchodu kolonou HPLC [33]

2.6.2 Použití při analýze flavonoidů

Metoda HPLC byla zjištěna jako selektivní a jednoduchá metoda pro určování flavonoidů z různých zdrojů. Používá se ve spojení s detektory jako např. UV-VIS (detekce ultrafialovým a viditelným zářením), DAD (detektor diodovým polem), PDA (detekce fotodiodovým polem), MS (hmotnostní spektrometrie). Studie se zabývají určováním flavonoidů rutinu a kvercetinů v plazmě kvůli zjištění jejich vstřebatelnosti v lidském organismu. Dále jsou např. stanovovány v různých druzích ovoce a zeleniny, což jsou díky obsahu flavonoidů významné zdroje antioxidantů z hlediska výživy. Pro využití do farmaceutického nebo potravinářského průmyslu je zjišťováno množství flavonoidů hlavně v bylinách [34][35][36]

Při separaci a kvantifikaci flavonoidů pomocí HPLC se používají kolony C8, kde náplň kolony obsahuje oktanové skupiny, nebo C18, ve kterých jsou navázané oktandodecylóvé skupiny na povrchu stacionární fáze, jejímž základem je silikagel. Podle druhu kolony a separovaných látek (druhů flavonoidů) se určuje vhodná mobilní fáze, která je

složená z organické fáze, anorganické fáze a kyseliny upravující pH. Organickou fází pro flavonoidy bývá methanol nebo acetonitril, případně jejich kombinace ve směsi, která je doplněna fází anorganickou v podobě redestilované vody. K okyselování mohou být použity kyseliny organické jako např. kyselina octová, kyselina mravenčí nebo je možné použít i kyseliny anorganické jako např. kyselinu fosforečnou.

Poměry organické a anorganické fáze v eluentu určují a ovlivňují retenční časy a tvary píků daných separovaných látek. Acetonitril přispívá k rychlému snižování retenčního času stejně jako methanol. Vyšší obsah kyseliny pozitivně ovlivňuje tvary píků, protože dochází k jejich zužování na základě snížení pH a také snižuje dobu průchodu látky kolonou, což celkově zkracuje dobu analýzy. Musí se však pro každý vzorek a pro každou analyzovanou látku optimalizovat správně podmínky HPLC, aby nedošlo např. ke sloučení dvou píků v jeden a tedy ke špatné separaci a určení daných látek. [35]

Při optimalizaci se upravují poměry organické a anorganické fáze, hodnota pH, teplota na koloně a průtok mobilní fáze kolonou. Podle dosavadních studií průtok mobilní fáze kolonou a teplota neovlivňují tvary píků nijak zásadně, retenční časy jsou však těmito změnami ovlivněny. Nejdůležitější je úprava pH a s tím souvisejí i poměry sloučenin v mobilní fázi.

Všechny parametry se musí řídit podmínkami, které mohou působit na kolonu, což je výrobcem určeno. Např. hodnota pH může být pouze v rozmezí 2-9, vyšší i nižší hodnota by kolonu zničila.

Souhrny s doposud využívanými podmínkami pro analýzu rutinu a kvercetinu jsou zmíněny v následujících částech.

2.6.2.1 HPLC podmínky pro rutin

V Tab. 1 jsou uvedeny příklady podmínek pro HPLC k stanovení flavonoidu rutinu, které byly použity v několika studiích. Při porovnání zjistíme, že pro separaci byly ve všech případech použity kolony C18. Rozměry daných kolon, jejich vnitřní průměry, délka a velikosti částic sorbentu, kterým jsou naplněny, se však poněkud liší. S tím souvisí i nastavení různých průtoků danou kolonou, aby došlo k správné separaci látek ve vzorku. Čím kratší kolona je použita, tím nižší musí být i rychlost průtoku eluentu, aby došlo k dostatečné separaci látek při průchodu kolonou.

Pokud byl pro detekci použit UV-VIS detektor, hodnota vlnové délky byla nastavena okolo 360-370 nm, protože při této vlnové délce má rutin své absorpční maximum. V případech mobilní fáze se jako organická část více vyskytuje acetonitril než methanol a na okyselování je použita nejčastěji kyselina octová.

Hodnoty teplot nejsou v tabulce uvedeny, protože stejně jako některé průtoky nebyly ve všech studiích uvedeny. Pokud byly teploty uvedeny, šlo o teploty okolí a maximální uvedené teploty se používaly do 40 °C.

Ve 3 uvedených příkladech z 5 byly použité izokratické podmínky pro separaci, což zjednodušuje analýzu. Naopak ve třetí a páté uvedené studii byl použitý gradient, který je náročnější, ale dochází k lepšímu odseparování látek ve směsi. Při jeho používání se musí připravit minimálně 2 mobilní fáze a samozřejmě musí použitý přístroj HPLC dovolovat nastavení gradientu.

Tab. 1 Příklady HPLC podmínek pro stanovení rutinu

č.	typ kolony	rozměry kolony a částic	mobilní fáze	UV detekce	průtok (ml/min)	gradient
1. [37]	Zorbax Extend-C18 RP	150x4,6 mm, 5µm vel.č.	methanol: voda (1:1), (pH 2,8) kys. fosforečná	360 nm	1	
2. [38]	Luna C18	150x2,1 mm , 5 µm vel.č.	Acetonitril: 10mM ammonium acetát s 300mM EDTA: ledová kys.octová (16,5:82,5:1) (pH 3,8)	370 nm	0,3	
3. [39]	RP-C18	250x4 mm	A-acetonitril: methanol (1:2) B-75% vodný roztok kys. fosforečné	380 nm	neuveden	100-40% B (20 min) 40-0% B (20 min) 100% B (10 min)
4. [40]	Eurospere C18 RS	250x4,6 mm	Octový pufr(pH 4,8): acetonitril (80:20)	DAD540 255 nm	neuveden	
5. [41]	Phenomex C18 Synergi4u Hydro-RP 80A	150x3,0 mm,	Eluent A – 2% k. octová, Eluent B – 0,5% kys. octová: acetonitrilu (50:50)	358 nm	neuveden	90-26% A (16 min), 26-0% A (2 min), 0% A (5 min), 0-90% A (1 min), 90% A (6 min)

2.6.2.2 HPLC podmínky pro kvercetin

Pro podmínky analýzy kvercetinu pomocí HPLC platí zásady dosti podobné jako tomu bylo u rutinu (viz kap. 2.6.2.1). Ve všech uvedených příkladech zabývajících se stanovením kvercetinu byly použity kolony C18 o různých délkách, vnitřních průměrech a velikostí částic sorbentu. Tím pádem se liší i průtoky mobilní fáze danou kolonou.

Z důvodů podobnosti rutinu a kvercetinu mají absorpční maximum oba okolo 360-370 nm, což ve většině postupů bylo také nastaveno. Velkou absorpci však vykazuje kvercetin i při 260 nm, což bylo použito ve studii uvedené v Tab. 2 na 5. pozici.

Stanovování kvercetinu bylo prováděno jak gradientovou, tak izokratickou elucí, stejně jako při separaci rutinu. Nedá se zobecnit, která z daných technik je pro kvantifikaci kvercetinu lepší, protože vždy záleží i na zdroji, tedy reálném vzorku, ze kterého je látka získávána.

Mobilní fáze se také velmi odlišují. Při porovnávání studií je viditelné pouze nejčastější užívání kyseliny fosforečné na úpravu pH. Obsah a složení organické fáze byly ve všech studiích dosti odlišné.

Tab. 2 Příklady HPLC podmínek pro stanovení kvercetinu

č.	typ kolony	rozměry kolony a částic	mobilní fáze	UV detekce	průtok (ml/min)	gradient
1. [42]	C 18 lichrosphere 100 kolona	250x4,6 mm, 5µm vel. č.	Eluent A – 0,5% orthofosforečná kys. ve vodě Eluent B – methanol	370 nm	1	40-60% B(10 min), 60% B (11 min), 60-40% B (2 min), 40% B (3 min), 40%B(4min,equil.)
2. [11]	Jones Genesis C18	150x4,6 mm, 4 µm vel. č.	Eluent A – trifluoroctová kys. ve vodě (pH 2,5) Eluent B – acetonitril	fluoresc. detektor excitace-420 nm, emise-480 nm	0,75	85% A (2 min), 85-60%A (6 min), 60-80% A (4 min), 80% A (5 min), 80-10% A (8 min), 10-85% A (10 min)
3. [43]	Platinum EPS C18 100A	250x4,6 mm, 5µm vel. č.	fosfátový pufr (pH=2): tetrahydrofuran: methanol: isopropanol (70:15:10:20)	380 nm	0,7	
4. [36]	Luna C18	150x2,0 mm, 5 µm vel. č.	acetonitril: 10mM ammonium acetátu 0,3 mM EDTA: ledová kys. octová (29:70:1) (pH 3,8) plazma, (26:73:1) (pH=3,9) moč	370 nm	0,3	
5. [44]	Separon SGX C18	150x3 mm	acetonitril ve vodě (0,05%): orthofosforečná kys. (40:60)	260 nm	0,5	
6. [45]	Luna C18	250x4,1 mm	Eluent A -25mM fosfátový pufr (pH 2,5) Eluent B – methanol	DAD	1	22-100% B (33 min)

2.6.2.3 HPLC podmínky pro kvercetin a rutin ve směsi

Porovnáváním podmínek pro HPLC při separaci rutinu a kvercetinu ve směsi se data liší, ale je možné najít určité podobnosti (viz Tab. 3). Ve 3 studiích z 5 byla pro okyselování mobilní fáze použita kyselina octová. Jako organická složka byl ve 4 příkladech použit methanol, z toho jen v jednom případě z nich je v kombinaci s acetonitrilem. Kolony jsou opět jako v předcházejících tabulkách (Tab. 1 a Tab. 2) použity hlavně C18 s výjimkou jediné C8 kolony uvedené v 1. řádku tab. 3.

Byla použita buď gradientová eluce nebo jednoduchá izokratická pro separaci. Detekce pomocí UV-VIS byla nastavena při vlnové délce okolo 360 nm.

Tab. 3 Příklady HPLC podmínek pro stanovení kvercetinu a rutinu ve směsi

č.	typ kolony	rozměry kolony a částic	mobilní fáze	UV detekce	průtok (ml/min)	gradient
1. [46]	Agilent Eclipse XDB-C8	150x4,6 mm, 5 µm vel. č.	kys. octová: methanol: voda (5:40:55)	360 nm	0,8	
2. [47]	HIQ SIL C18V RP	250x4,6 mm, 5 µm vel. č.	methanol: acetonitril: voda (40:15:45) obs. 1% kys. octové	257 nm pro rutin, 368 nm pro kvercetin	1	
3. [48]	Waters YMC ODS-AQ RP-18 Protected Waters Delta-Pak RP-18	250x4,6 mm, 5 µm vel. č., 120Å	Eluent A – 20% methanol a 0,5% TFA ve vodě Eluent B – 10 % methanol a 0,5% TFA v acetonitrilu	UV spektra pomocí PAD (fotodiodového pole)	1	90-30% A (20 min) 30-10% A (5 min) 10-0% A (5 min) 0% A (30 min) 0-90% (5 min)
4. [49]	C18 Symmetry + ochranná kolona C18 Symmetry (Waters)	150x3,9 mm, 5 µm vel. č., ochranná kolona 20x3,9 mm, 5µm	Acetonitril ve vodě upravený kys. fosforečnou na pH 2,5	365 nm	1	15-35% acetonitrilu ve vodě (20 min)
5. [50]	Econosil C18 10U + ochranná kolona	250x4,6 mm	Eluent A-methanol: kys. octová (95:5) Eluent B-voda	350 nm	neuveden	30-60% A (30 min) 60-100% (5 min)

Obecně veškeré podmínky pro kvantifikaci látek ve směsi záleží nejen na rozměrech kolony, poměrech organické a anorganické fáze, pH a rychlosti průtoku mobilní fáze kolonou, ale separace je významně ovlivněna i složením reálného vzorku, ze kterého dané látky chceme určovat. Působí zde doprovodné látky, které mohou být rušivými elementy. Mohou mít retenční časy podobné nebo dokonce stejné jako stanovovaná sloučenina a v tom případě dochází k překrývání nebo sloučení píků a nepřesné analýze. Tyto všechny vlivy musí být odstraněny při optimalizaci metody a nebo při úpravách vzorku ještě před nadávkováním vzorku do kolony.

3 Experimentální část

Experimentální část této diplomové práce byla zaměřena na identifikaci a kvantifikaci vybraných flavonoidů, rutinu a kvercetinu, v různých druzích sušených listů a větví bezu černého. Zjištěné množství flavonoidů se porovnávalo mezi různými druhy *Sambucus nigra* a také s obsahem těchto látek stanovených ve významných zdrojích. Pro srovnání bylo k dispozici 6 druhů bezu černého, z toho 5 odrůd bylo šlechtěných a 1 planě rostoucí.

Všechny odrůdy byly extrahovány 2 technikami, a to PSE a PHWE. Poté byly přečištěny přes SPE kolonky a analyzovány na HPLC s DAD detektorem, u kterého byla pro detekci látek využita pouze jedna vlnová délka (360nm).

3.1 Pomůcky

- Běžné laboratorní sklo
- Celulózové mikrofiltry 0,45 μm (Chromservis, ČR)
- Injekční stříkačky, 2 ml a 3 ml (Chirana Injecta, SR)
- Třecí miska s tloučkem
- SPE kolonky, Oasis HLB 3cc (60mg) Extraction Cartridge (Waters, Irsko)

3.2 Přístroje

- Analytické váhy (Helago, Japonsko)
- Chladnička s mrazničkou (Amica, Polsko)
- HPLC chromatograf LC-10AD (Schimadzu, Japonsko)
 - o Pumpa GT-104 (Schimadzu, Japonsko)
 - o Odplyňovač FCV-10AL (Schimadzu, Japonsko)
 - o DAD detektor SPD-M10AVP (Schimadzu, Japonsko)
 - o Pec CTO-10A (Schimadzu, Japonsko)
 - o Kolona:
 - SUPELCO SILTM LC-8DB; 5 μm ; 250x 4, 6 mm (Supelco, USA)
- Laboratorní váhy (Kern KB, Německo)
- Mlýnek na kávu (Danesco, Česká republika)
- One PSE (Applied Separation, USA) s příslušenstvím pro PSE
- PHWE (Vyvinuté na Ústavu analytické chemie, Akademie věd Brno, Česká republika)
- Počítač Acer
- Software pro HPLC CLASS-LC10
- Ultrazvuková lázeň (Kraintek, Slovenská republika)

3.3 Chemikálie

- Acetonitril, supragradient HPLC grade (Scharlau Chanie S.A., Španělsko)
- Kyselina mravenčí, 98% (Lach-ner s.r.o., Neratovice, Česká republika)
- Kyselina octová, 99% (ONEX, Rožnov pod Radhoštěm, Česká republika)
- Methanol CHROMASOLV pro HPLC, min. 99,9% (SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Německo)
- Methanol pro HPLC super Gradient, min. 99,9% (Lach-ner s.r.o., Neratovice, Česká republika)
- Redestilovaná voda (FCH VUT Brno, Česká republika)
- Standardy:
 - o Rutin hydrát, min. 95% (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
 - o Kvercetin dihydrát (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
- Vzorky bezu černého
 - o Listy: odrůdy *Sambucus nigra*: Albida, Bohatka, Dana, Haschberg, Körsör (Výzkumný a šlechtický ústav ovocnářský Holovousy s.r.o., Holovousy, Česká republika)
 - o Listy plané odrůdy (Velké Pavlovice, Česká republika)
 - o Větve: odrůdy *Sambucus nigra*: Albida, Bohatka, Dana, Haschberg, Körsör (Výzkumný a šlechtický ústav ovocnářský Holovousy s.r.o., Holovousy, Česká republika)
 - o Větve plané odrůdy (Křtiny, Česká republika)

3.4 Optimalizace separačního systému na standardech

3.4.1 Příprava mobilní fáze

- voda: methanol: kyselina octová (H_2O : $MeOH$: CH_3COOH) v poměrech:
 - o 55: 40: 5
 - o 75: 20: 5
 - o 60: 35: 5
- voda: methanol: kyselina mravenčí (H_2O : $MeOH$: $HCOOH$) v poměrech:
 - o 61,5: 36: 2,5
 - o 57,4: 40: 2,6
 - o 52,4: 45: 2,6
 - o 47,4: 50: 2,6
- acetonitril: methanol: voda (C_2H_3N : $MeOH$: H_2O) + kyselina octová (CH_3COOH) v poměrech:
 - o 15: 40: 45 + 1 % CH_3COOH , pH 3,175
 - o 15: 40: 45 okyseleno CH_3COOH na pH 2,33

Při změně mobilní fáze muselo vždy dojít k ustálení používané kolony. Všechny tyto mobilní fáze byly testovány na koloně SUPELCOSILTM LC-8DB o rozměrech 4,6x250 mm, velikost částic sorbetu byla 5 μm . Pro ustálení kolony bylo potřeba kolonu promýt 56,7-170,1 ml mobilní fáze. Při nastavení průtoku mobilní fáze na 0,7 ml/min bylo potřeba kolonu promývat 81-243 minut, aby došlo k ustálení sil působících v koloně.

3.4.2 Příprava roztoků standardů pro optimalizaci separační metody

Na zkušební standard rutinu byla navážka 0,0124 g na analytických vahách rozpuštěná ve 100% methanolu a doplněná na 100 ml v odměrné baňce. Výsledná koncentrace rutinu byla 0,1240 mg/ml.

Zkušební standard kvercetinu byl připraven ve 100ml odměrné baňce rozpuštěním 0,0116 g kvercetinu ve 100 ml methanolu. Výsledná koncentrace tedy byla 0,116 mg/ml.

Tyto připravené standardy byly při optimalizaci tvaru píků ředěny vodou, která byla do standardů přidávána postupně po 5 %, a to od 5 % objemu vody v roztoku vzorku do 60 %.

3.5 Úprava rostlinných matric

Jako rostlinné matrice se analyzovaly listy a větvičky bezu černého, které musely být před extrakcí rozdrceny, aby vznikla co nejvíce homogenní matrice.

Listy byly podrceny v misce tloučkem. Poté byly naváženy na laboratorních vahách 2 g vzorku s přesností na 2 desetinná místa. Vzorek se vložil do nerezových nádob, které byly nejprve utěsněné fritkou. Byl do nich nasypán inertní materiál v podobě skleněných kuliček o velikosti 500-700 μm (tzv. Balotina). Poté byly na inert dávány 2 g vzorku promíchané s kuličkami. Po naplnění patrony vzorkem byly nakonec nasypány inertní kuličky a takto připravená patrona se vložila do PSE extraktoru.

Získaný extrakt byl kvantitativně převeden do 50ml odměrné baňky a doplněn methanolem nebo vodou (podle extrakčního rozpouštědla) po rysku. Následně se musel pročistit přes SPE kolonku, ze které se získaly 2 ml vzorku ředěného oproti původnímu vzorku methanolem v poměru 1:3. Dávkovalo se totiž 0,5 ml vzorku extraktu a elovalo se 2 ml methanolu. Vzorek pro stanovení rutinu byl dále zředěn vodou v poměru 2:3. Tento výsledný roztok byl přefiltrován přes mikrofiltr a poté nadávkován do HPLC systému.

U větviček bezu černého bylo potřeba na rozdrcení použít mlýnek na kávu. Vzniklá homogenní směs se upravovala podobně jako u vzorků listů. Naváženy byly 2 g matrice, které byly vyextrahovány. Extrakt byl následně doplněn na 50 ml v odměrné baňce. Dále došlo k přečištění přes SPE kolonku, získaný vzorek se přefiltroval přes mikrofiltr a nadávkoval do HPLC smyčky (pro stanovení kvercetinu). Pro stanovení rutinu z extraktu větviček byl vzorek po přečištění přes SPE kolonku naředěn s vodou v poměru 2:3 (MeOH: H₂O).

3.6 Metody

3.6.1 PSE a PHWE

Navážka vzorků listů i kůry bezu černého byla 2 g. Jako extrakční rozpouštědlo byl použit methanol nebo voda. Při použití methanolu byly pro extrakci listů použity 3 cykly po 5 minutách, teplota 120 °C pro rutin a tlak 150 barů. Pokud byla použita voda, extrakční podmínky byly nastaveny na 3 cykly po 5 minutách, tlak 150 barů, teplota pro extrakci rutinu byla 80 °C. Pro získání flavonoidů z větviček byla teplota pro extrakci methanolem u rutinu i

kvercetin 120 °C, u extrakce vodou pro rutin 120 °C, pro kvercetin 100 °C, ostatní podmínky byly nastaveny stejně, tlak 150 barů a 3 cykly po 5 minutách.

3.6.2 SPE-solid phase extraction (extrakce na pevné fázi)

Před nástřikem vzorku do HPLC smyčky musel být extrakt upraven na SPE kolonce. Kolonka se aktivovala promytím 2 ml methanolu, následně 2 ml vody. Po aktivaci se nadávkovalo na kolonku 0,5 ml extraktu a při průchodu došlo k zachycení zkoumaných látek, které byly následně ze sorbetu eluovány 2 ml methanolu do čisté zkumavky. Tento postup je podle návodu výrobce.

3.6.3 HPLC

Separace vzorku probíhala na koloně SUPELCOSILTM LC-8DB, která měla rozměry 250x4,6 mm. Velikost částic sorbetu byla 5 µm. Jako mobilní fáze se používala směs MeOH: H₂O: HCOOH v poměru 36: 61,5: 2,5. Hodnota pH byla v rozmezí 2,17-2,27. Průtok eluentu kolonou byl nastaven na 0,7 ml/min a teplota na koloně byla 30 °C. Velikost dávkovací smyčky pro vzorek byla 10 µl. Látky se detekovaly pomocí detektoru diodovým polem, kde byla nastavena pouze jedna vlnová délka 360 nm.

3.6.4 Příprava kalibrační křivky

3.6.4.1 Rutin

Pro přípravu kalibrační křivky byl připraven standardní roztok rutinu rozpuštěného ve 100% methanolu. Na přípravu tohoto roztoku bylo na analytických vahách naváženo 0,0100 g rutinu, kvantitativně převedeno do 100 ml odměrné baňky a doplněno methanolem po rysku. Výsledná koncentrace standardního roztoku byla 0,1mg/ml.

Kalibrační řada byla připravena napipetováním 0,2; 1; 2; 5; 10 ml roztoku do 25ml odměrných baněk a doplněna methanolem po rysku. Poté byly z každého roztoku odebrány 2 ml vzorku a naředěny 3 ml vody (ředění 2:3, methanol: voda). Výsledné koncentrace pro kalibrační křivku byly 0,00032; 0,0016; 0,0048; 0,008 a 0,016 mg/ml. Každá koncentrace byla proměřena třikrát a z průměrných hodnot velikosti ploch píků byl sestrojen graf závislosti plochy píku na koncentraci rutinu. Z rovnice regrese byla vypočítána koncentrace rutinu v reálných vzorcích.

3.6.4.2 Kvercetin

Pro přípravu kalibrační křivky kvercetin se připravil standardní roztok o koncentraci 0,1 mg/ml, ze kterého se napipetovalo 3, 4, 6, 8 a 10 ml do 25ml odměrných baněk, které byly doplněné methanolem po rysku. Výsledné koncentrace kalibračních roztoků byly 0,012; 0,016; 0,024; 0,032 a 0,04 mg/ml. Každá koncentrace byla proměřena třikrát a z průměru ploch píků byla sestrojena kalibrační křivka pro kvercetin. Z rovnice regrese se poté vypočítaly koncentrace kvercetin v reálných vzorcích.

3.6.4.3 Přepočet koncentrace látek na 1 gramu vzorku

Koncentrace rutinu získaná z regresní rovnice je koncentrace v 5 ml vzorku rutinu zředěného 2:3, MeOH: H₂O. U kvercetinu je koncentrace ve 2 ml vzorku kvercetinu rozpuštěného v methanolu. Proto z koncentrace vypočítáme množství rutinu v 5 ml, kvercetinu ve 2 ml, podle rovnice (1), kde za c dosadíme vypočítanou hodnotu koncentrace z regresní rovnice a za V dosadíme 5 ml pro rutin a 2 ml pro kvercetin.

$$m_{v0,5ml} [mg] = c [mg/ml] \cdot V [ml] \quad (1)$$

Zjištěná hmotnost rutinu a kvercetinu byla získána z 0,5 ml reálného vzorku. Musíme tuto hodnotu vynásobit 100, protože reálného vzorku bylo 50 ml (viz rovnice (2)). Dále hodnotu vydělíme dvěma (viz rovnice (3)), protože 50 ml vzorku jsme získali z 2 gramů listů bezu černého. Výslednou hodnotu dostaneme v mg rutinu na g vzorku. Jednotky upravíme dále podle určeného množství rutinu na mikrogramy nebo gramy.

$$m_{v50ml} = m \cdot 100 \quad (2)$$

$$c [mg / g] = \frac{m_{v50ml} [mg]}{m_{vzorku} [g]} \quad (3)$$

4 Výsledky a diskuse

4.1 Optimalizace podmínek pro extrakci metodou PSE

Pro extrakce byly vybrány podmínky na základě literatury [51], kde se pro získání flavonoidů používaly 3 extrakční cykly po 5 minutách. Jako extrakční rozpouštědlo byl použit methanol. Teplota extrakce byla optimalizována porovnáním množství vyextrahovaných látek. Bylo srovnáváno množství látek získané při teplotách 40, 60, 80, 100 a 120 °C a tlak byl nastaven na 150 barů.

Stejné podmínky byly nastaveny i pro optimalizaci extrakce vodou. Srovnávané byly též teploty 40, 60, 80, 100 a 120 °C.

4.1.1 Listy

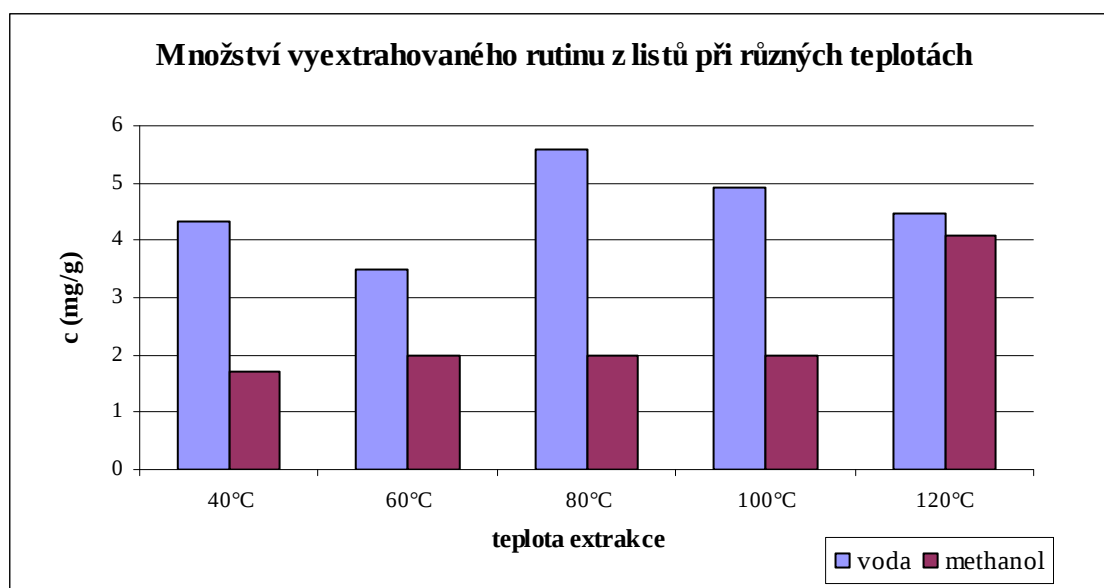
Pro optimalizaci podmínek pro HPLC metodu byly použité listy plané odrůdy bezu černého. Při porovnání výsledků extrakcí methanolem při různých teplotách bylo analyzováno největší množství rutinu při použití teploty 120 °C. V Grafu 1 je vidět, že množství rutinu při jiných teplotách je téměř o polovinu nižší. Proto byla tato teplota zvolena jako nejvhodnější pro extrakci rutinu methanolem z listů bezu černého.

Stejné podmínky byly testovány i pro extrakci vodou. Po srovnávání teplot se získalo nejvyšší množství rutinu při teplotě 80 °C, proto byla dále použita tato teplota pro extrahování rutinu z odrůd bezu černého. Množství rutinu získaného extrakcí vodou bylo vyšší v porovnání s množstvím získaným extrakcí methanolem při 120 °C (viz Tab. 4). Z tohoto hlediska by byla voda vhodnější pro získání nej přesnějších výsledků.

Bylo srovnáváno pouze množství rutinu, protože kvercetin nebyl v extraktu listů detekován. Pokud se kvercetin v listech nachází, tak pro používanou metodu jde o koncentraci, která je pod mezí detekce kvercetinu (viz kap. 4.3). Následující tabulka porovnává zjištěné množství rutinu získaného při různých teplotách extrakce a při použití různých extrakčních rozpouštědel

Tab. 4 Koncentrace rutinu v listech plané odrůdy bezu černého

teplota extrakce	extrakce methanolem	extrakce vodou
	c (mg/g)	c (mg/g)
40°C	1,73	4,31
60°C	1,99	3,50
80°C	2,00	5,58
100°C	2,00	4,94
120°C	4,09	4,47



Graf 1 Srovnání získaného množství rutinu z listů při různých teplotách extrakce

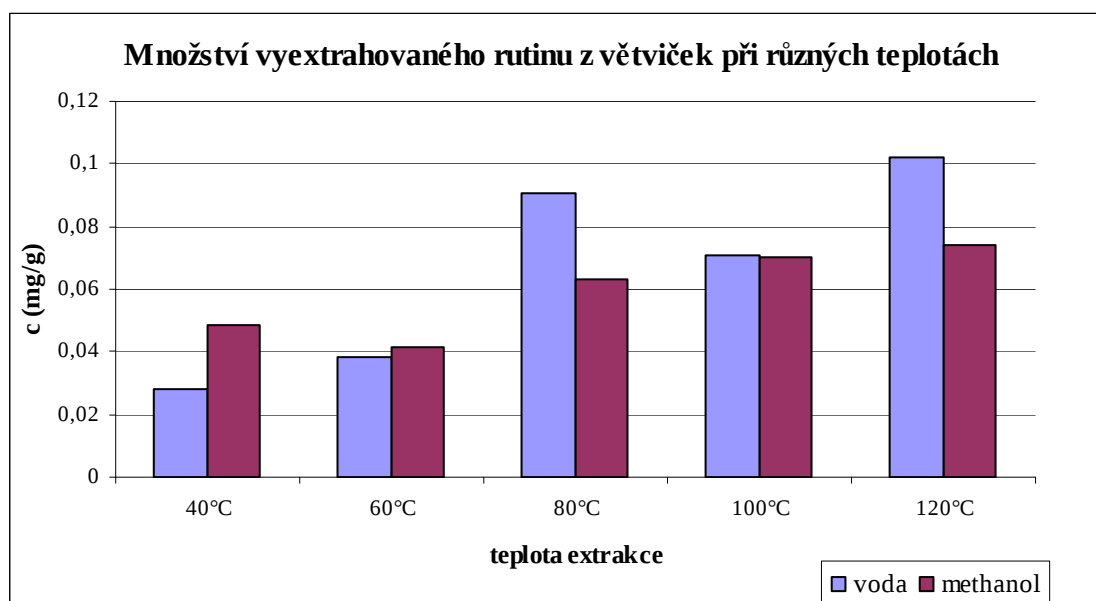
4.1.2 Větvičky

Optimalizace metody PSE byla prováděna na větvičkách plané odrůdy bezu černého. Z Grafu 2 je viditelné, že závislost koncentrace rutinu na extrakční teplotě je stejná jako při extrakci rutinu z listů bezu černého. Teplota 120 °C byla nejúčinnější u extrakce methanolem i vodou. Z toho vyplývá, že při extrakci methanolem složení matrice neovlivňuje extrakční účinnost. Vodou bylo nejvyšší množství rutinu z větví získáno při 120 °C, což je odlišná hodnota než při optimalizaci pro listy. Lze tedy předpokládat, že u extrakce vodou je složení matrice rozhodující pro extrakční účinnost metody.

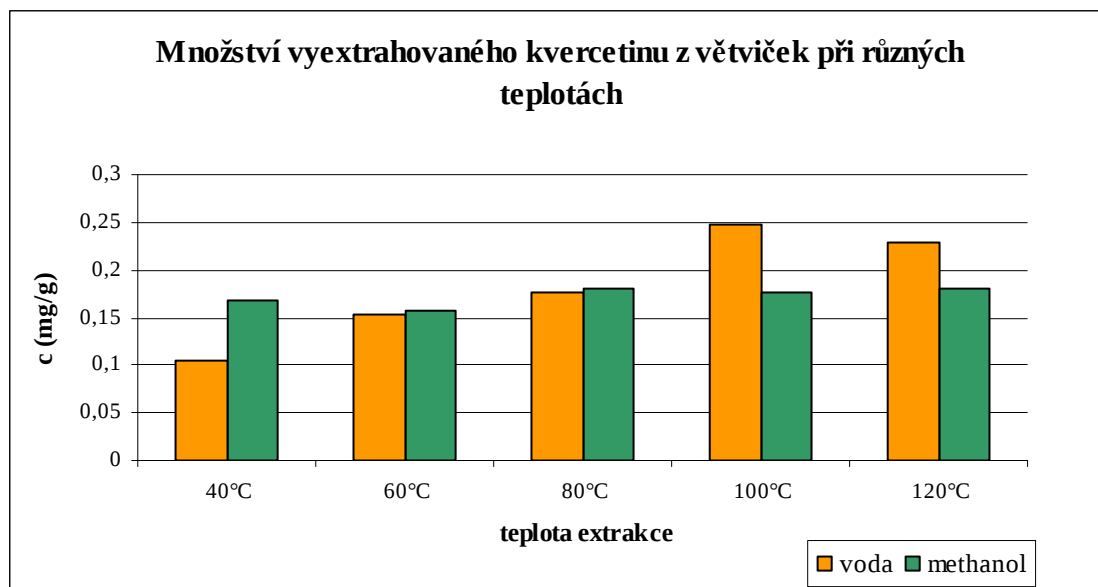
Při extrahování kvercetinu byla zjištěna jako nejvhodnější teplota pro extrakci methanolem teplota 120 °C (jako u rutinu). Vodou bylo vyextrahováno největší množství kvercetinu z větviček při teplotě 100 °C. Stejně jako u rutinu se jednalo o množství vyšší než bylo získáno při extrakci methanolem (viz Graf 3 a Tab. 5). Proto byla voda použita jako extrakční rozpouštědlo pro získání kvercetinu z větví šlechtěných odrůd bezu černého. V následující tabulce je srovnáno zjištěné množství rutinu a kvercetinu získané při různých teplotách extrakce a při použití různých extrakčních rozpouštědel

Tab. 5 Koncentrace rutinu a kvercetinu ve větvičkách

teplota extrakce	extrakce methanolem		extrakce vodou	
	kvercetin (mg/g)	rutin (mg/g)	kvercetin (mg/g)	rutin (mg/g)
40°C	0,17	0,05	0,10	0,03
60°C	0,16	0,04	0,15	0,04
80°C	0,18	0,06	0,18	0,09
100°C	0,18	0,07	0,25	0,07
120°C	0,18	0,07	0,23	0,10



Graf 2 Srovnání získaného množství rutinu z větviček při různých teplotách extrakce



Graf 3 Srovnání získaného množství kvercetinu z větviček při různých teplotách extrakce

4.2 Optimalizace separačního systému HPLC

Pro stanovení optimálních podmínek analýzy pomocí HPLC byly použity standardy rutinu a kvercetinu, které se připravily rozpuštěním navážky těchto látek v methanolu.(viz kap. 3.4.2)

4.2.1 Testování poměru MeOH v mobilní fázi

V první řadě byl testován vliv obsahu methanolu, tedy organické fáze, na retenční časy rutinu a kvercetinu. Jako mobilní fáze byla použita směs MeOH: H₂O: CH₃COOH v různém poměru. Jako první byl vyzkoušen na základě literatury [46] poměr mobilní fáze 40: 55: 5. Hodnota pH byla 2,6. Píky obou sloučenin rutinu i kvercetinu byly neforemné, zdvojené a měly velmi malý počet teoretických pater, účinnost separace tedy nebyla vysoká. Dále byla vyzkoušena mobilní fáze v poměru 20: 75: 5 (pH 2,3), kde se píky ještě více rozšířily a retenční časy se prodloužily. Kvercetin vycházel z kolony až v 60. minutě. Proto byl vyzkoušen poměr 35: 60: 5 (pH 2,6), který byl nejlepší vzhledem k délce analýzy. Tato mobilní fáze byla tedy používána. Změna koncentrace methanolu však neměla vliv na tvary píků.

4.2.2 Přídavek vody do standardů

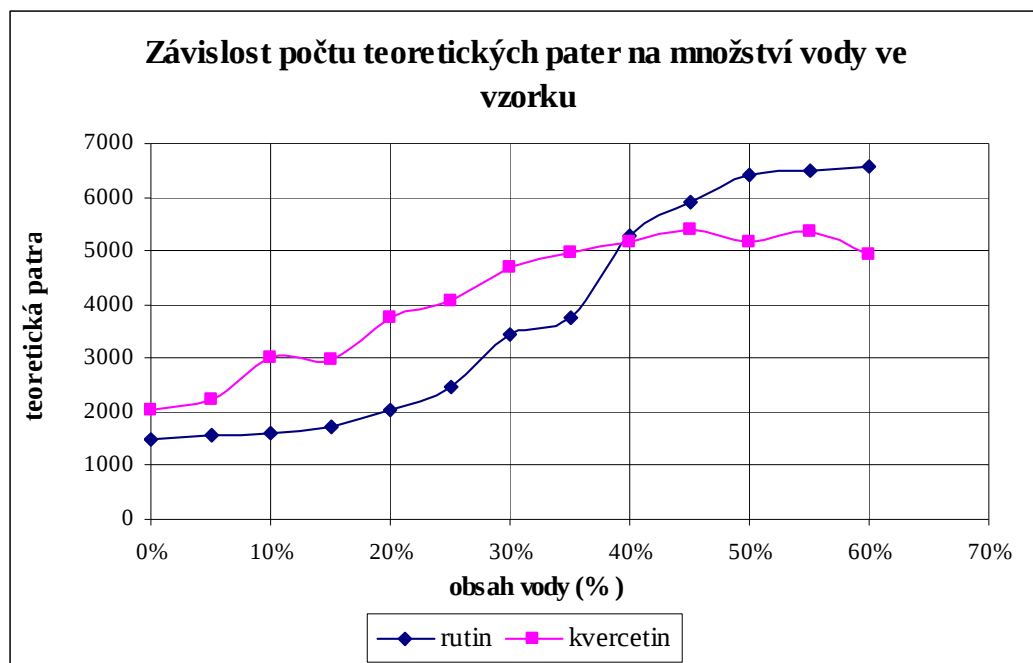
K úpravě tvaru píků bylo na základě literatury [52] použito ředění vzorku vodou. Zkušební vzorky rutinu a kvercetinu byly rozpuštěné ve 100% methanolu. Vzhledem k tomu,

že se má mobilní fáze a roztok vzorku co nejvíce podobat, byla postupně přidávána ke vzorku voda, anorganická fáze, a tím se snižoval poměr fáze organické. Došlo ke zlepšování tvaru píků. V Tab. 6 jsou uvedené výsledky teoretických pater píků rutinu a kvercetin a jejich vyhodnocení je v Grafu 4.

Z grafu je vidět růst počtu teoretických pater obou píků v závislosti na přidané vodě do roztoku vzorku. Bylo zkoumáno pouze ředění do 60 % obsahu vody, protože při ředění 65 % docházelo k vypadávání krystalků vzorku a nebylo možné ho dávkovat do HPLC systému. Pro další úpravu píků se tedy používal vzorek s ředěním 2:3, MeOH: H₂O. Z grafu je vidět, že kvercetin vykazoval nejvyšší počet teoretických pater při 45% přídavku vody. Pík kvercetinů však měl viditelný „tailing“, který snižoval jeho počet teoretických pater. „Tailing“ bylo potřeba odstranit okyselením mobilní fáze.

Tab.6 Počet teoretických pater rutinu a kvercetin

nástřík standardů rutinu a kvercetin				
obsah vody v roztoku	rutin		kvercetin	
	retenční čas (min)	teoretická patra	retenční čas (min)	teoretická patra
0%	7,4	1491	15,6	2015
5%	7,4	1578	14,9	2215
10%	7,4	1619	15,2	3017
15%	7,4	1726	15,2	2979
20%	7,3	2034	15,3	3771
25%	7,3	2467	15,1	4068
30%	7,2	3454	14,9	4704
35%	7,2	3747	14,7	4964
40%	7,4	5290	14,7	5152
45%	7,5	5894	15,9	5390
50%	7,6	6403	15,9	5150
55%	7,5	6483	15,7	5347
60%	7,5	6556	15,5	4911
nástřík směsného standardu				
obsah vody v roztoku	rutin		kvercetin	
	retenční čas	teoretická patra	obsah vody v roztoku	retenční čas
60%	7,5	6683	15,4	4281
60%	7,5	6555	15,4	4186



Graf 4 Růst počtu teoretických pater v závislosti na přídavku vody do vzorku

4.2.3 Změna kyseliny octové na kyselinu mravenčí

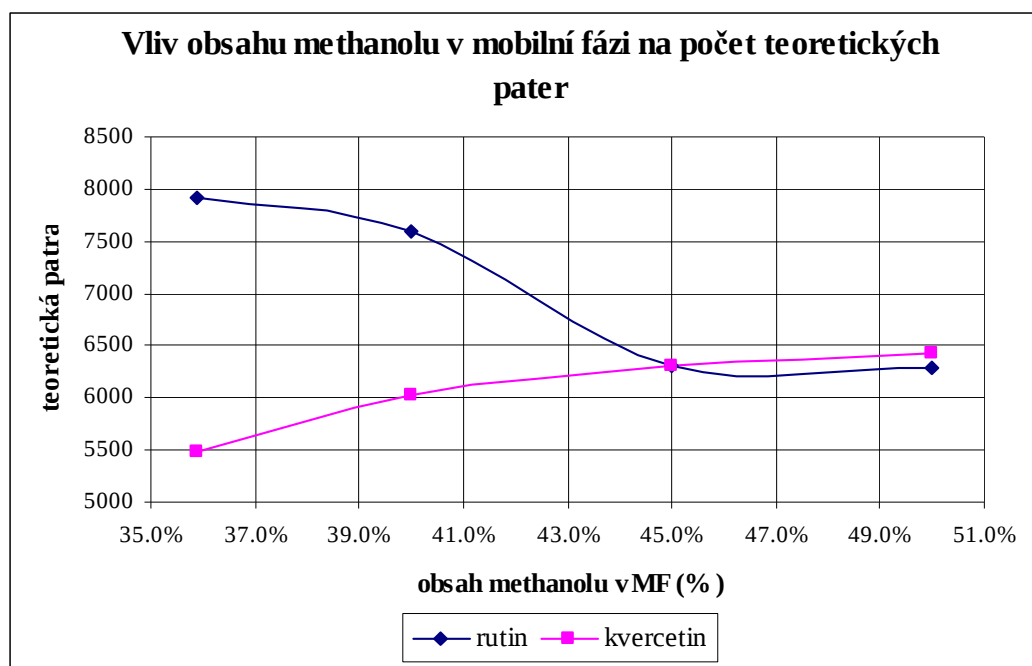
Kvůli „tailing“ píku kvercetinu bylo potřeba snížit hodnotu pH. Proto byla kyselina octová nahrazena kyselinou mravenčí, která je silnější. Kolona dovozovala pH od 2 do 9, proto při úpravách nesmělo pH klesnout pod hodnotu 2. Pro zachování stejného poměru methanolu a vody jako u mobilní fáze s kyselinou octovou byl výsledný poměr 36: 61,5: 2,5 (MeOH: H₂O: HCOOH). Hodnota pH byla 2,2, počet teoretických pater rutinu byl okolo 8000 a kvercetinu okolo 5500. Retenční časy se pohybovaly pro rutin v rozmezí 9,3-9,4 minut a pro kvercetin v rozmezí 21,7 – 21,9 minut.

Kvůli zkrácení doby analýzy bylo experimentováno s poměrem methanolu v mobilní fázi, protože vyšší poměr organické fáze zkracuje retenční časy sloučenin (viz kap. 2. 6. 2). Hodnoty teoretických pater jsou uvedeny v Tab. 7. Byly testovány mobilní fáze s poměrem methanolu 40 %, 45 %, 50 %. Fáze byly okyseleny 2,5 % kyseliny mravenčí a voda byla doplňována do 100 %.

Tab. 7 Vliv poměru methanolu v mobilní fázi a hodnoty pH na teoretická patra

obsah MeOH v m.f.(%)	průtok (ml/min)	pH	číslo měření	rutin		kvercetin	
				ret. čas (min)	teor.pat.	ret. čas (min)	teor.pat.
36%	0,7	2,193	1	9,4	8031	21,9	5517,
			2	9,3	7812	21,8	5443
			<i>Průměr</i>	<i>9,4</i>	<i>7922</i>	<i>21,9</i>	<i>5480</i>
40%		2,255	1	8,2	7580	18,1	6082
			2	8,2	7624	17,9	5969
			<i>Průměr</i>	<i>8,2</i>	<i>7602</i>	<i>18,0</i>	<i>6026</i>
45%		2,296	1	6,0	6274	10,5	6309
			2	6,0	6352	10,5	6305
			<i>Průměr</i>	<i>6,0</i>	<i>6313</i>	<i>10,5</i>	<i>6307</i>
50%		2,285	1	5,3	6322	8,0	6470
			2	5,3	6246	8,0	6381
			<i>Průměr</i>	<i>5,3</i>	<i>6284</i>	<i>8,0</i>	<i>6426</i>

Průměrné hodnoty teoretických pater u rutinu a kvercetin byly v závislosti na množství methanolu v mobilní fázi vyneseny do grafu. Na Grafu 5 je vidět, že počet teoretických pater u rutinu klesá s přidavkem methanolu a naopak počet teoretických pater u kvercetin stoupá. Retenční časy se v závislosti na množství methanolu ve směsi snižovaly. Protože rutin a kvercetin měly protichůdné chování v závislosti na zvyšování poměru methanolu, bylo potřeba vyzkoušet reálný vzorek a nebo jinou mobilní fázi.



Graf 5 Změny počtu teoretických pater s přidavkem methanolu do mobilní fáze

4.2.4 Mobilní fáze se směsí AcCN a MeOH

Na základě studie [47] byla na separaci rutinu a kvercetinu použita jako mobilní fáze směs AcCN : MeOH : H₂O v poměru 15: 40: 45, okyselená 1 % kyseliny octové. Výsledné pH bylo 3,175. Vzhledem k malé kyselosti mobilní fáze bylo přidáno více kyseliny octové pro dosažení pH okolo 2,2 – 2,4. Výsledné pH bylo 2,330. Při použití takto okyselené mobilní fáze se teoretická patra u rutinu pohybovala okolo 5362 a u kvercetinu okolo 5306. Retenční čas pro rutin byl 4,4 minuty a pro kvercetin 5,3 minuty. Tedy oba píky byly blízko sebe, ale úplně odseparované. Tato mobilní fáze by byla výhodná z hlediska délky analýzy i počtu teoretických pater obou látek. Avšak vzhledem k blízkosti obou píků bylo potřeba zjistit, zda se látky v reálném vzorku od sebe dostatečně odseparují.

4.2.5 Nástřik zkušebního reálného vzorku

Pro rozhodnutí o vhodnosti mobilní fáze pro separaci vzorku musely být vyzkoušené reálné vzorky. Při používání mobilní fáze AcCN : MeOH: H₂O: CH₃COOH (pH 2,3) nedošlo k separaci sloučenin v reálném vzorku, proto byla tato fáze nevhodná.

Při použití mobilní fáze MeOH: H₂O: HCOOH v poměru 50: 47,5: 2,5 (pH 2,3) také nedošlo k úplné separaci látek v reálném vzorku. Proto byla vyzkoušena mobilní fáze MeOH: H₂O: HCOOH v poměru 36: 61,5: 2,5 (pH 2,2), kde došlo k separaci vzorku a identifikaci píků rutinu, který měl v blízkosti další píky neznámých látek. Kvůli doprovodným látkám ve vzorcích nemohly být použité mobilní fáze s vyšším poměrem methanolu v mobilní fázi než 36 %, aby nedocházelo na základě zrychlení analýzy (zkrácení retenčních časů) ke slučování píků doprovodných látek se stanovovaným rutinem či kvercetinem. Z tohoto důvodu byla mobilní fáze MeOH: H₂O: HCOOH (v poměru 36: 61,5: 2,5) vybrána jako optimální pro určení rutinu a kvercetinu z reálných vzorků listů a větviček bezu černého.

4.3 Mez detekce a mez stanovitelnosti

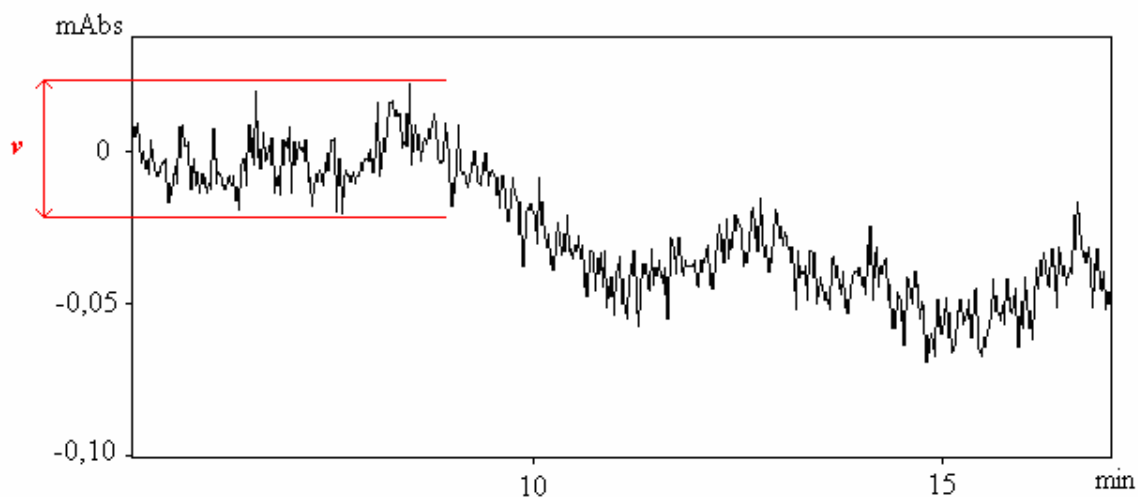
4.3.1 Rutin

Mez detekce se určuje jako trojnásobek maximálního kolísání základní linie slepého pokusu a odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. Odezva signálu se sleduje po dobu, která se určí jako dvacetinásobek poloměru šířky píku. [53]

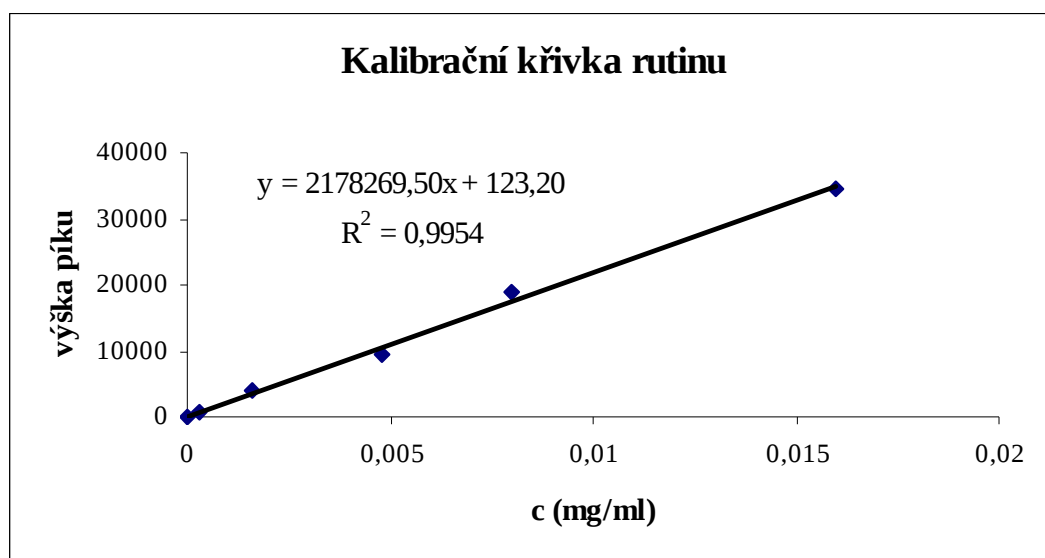
Šířka píku rutinu byla určena na 0,6 minut, takže odezva signálu byla sledována po dobu 12 minut. Maximální kolísání základní linie (hodnota v viz Obr. 17) slepého vzorku bylo 44 strojových jednotek. Při přepočtu na koncentraci se odezva signálu vynásobí 3 a vydělí směrnici (b) kalibrační křivky (Graf 6) sestavené jako závislost výšky píku na koncentraci látky v 5 ml vzorku ředěného vodou 2: 3 (MeOH: H₂O).

U meze stanovitelnosti se hodnota kolísání linie vynásobí 10 a vydělí opět směrnici kalibrační křivky pro získání koncentrace (mez stanovitelnosti). [53]

Pro rutin byla mez detekce určena na $6 \cdot 10^{-5}$ mg/ml a mez stanovitelnosti na $2 \cdot 10^{-4}$ mg/ml.



Obr. 17 Odezva signálu slepého pokusu sledovaná 12 minut



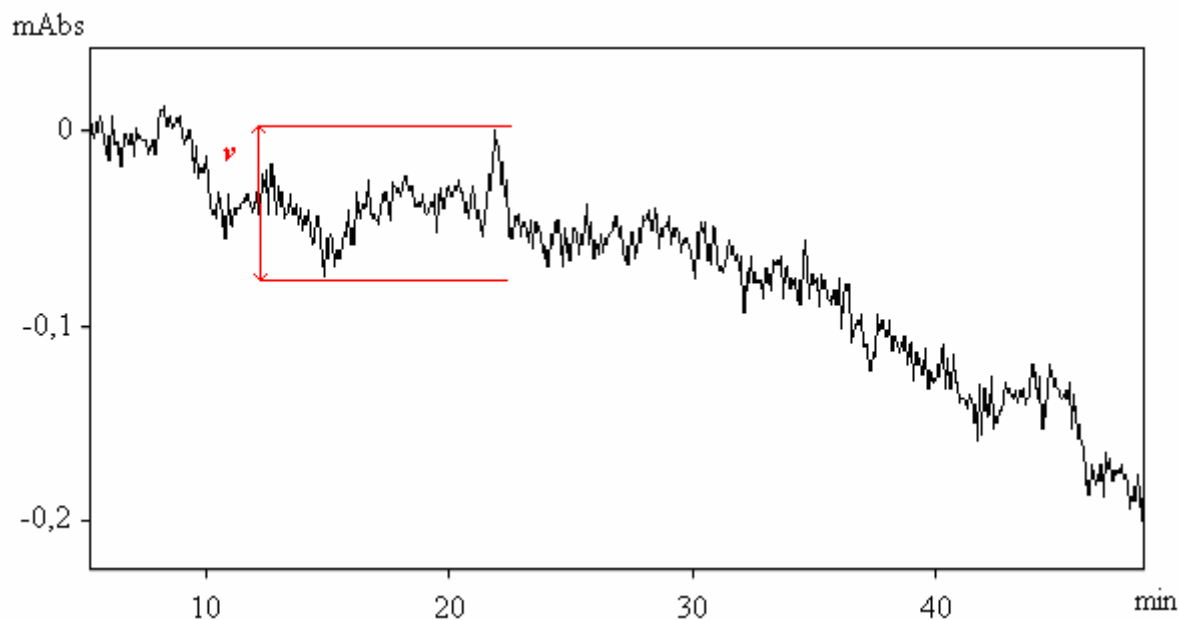
Graf 6 Kalibrační křivka rutinu

4.3.2 Kvercetin

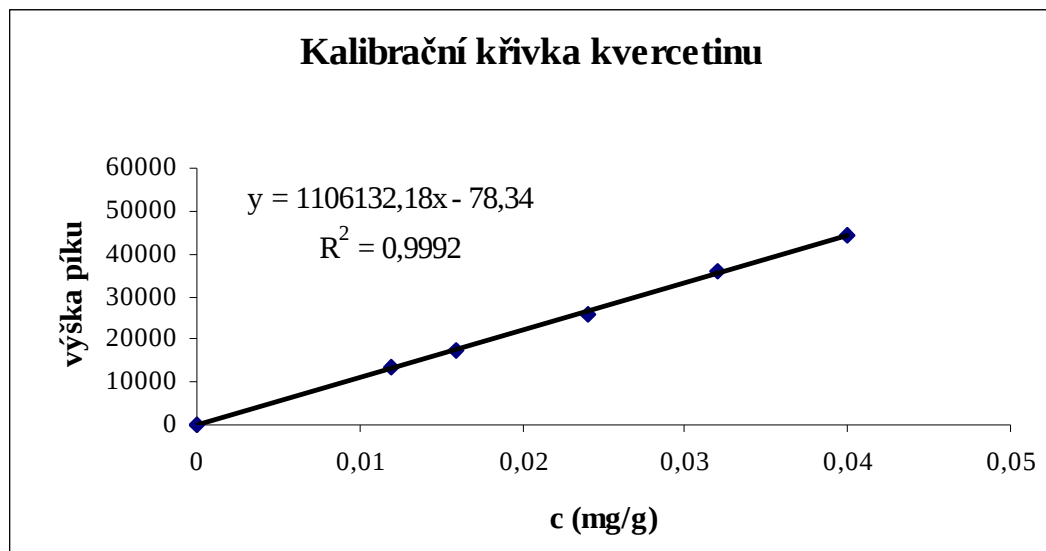
Šířka píku kvercetinu byla určena na 5 minut, takže odezva signálu byla sledována po dobu 100 minut. Maximální kolísání základní linie slepého vzorku bylo 70 strojových jednotek (viz Obr. 18). Při přepočtu na koncentraci se odezva signálu vynásobí 3 a vydělí směrnici (b) kalibrační křivky (Graf 7.) sestrojené jako závislost výšky píku na koncentraci látky ve vzorku kvercetinu rozpuštěném v methanolu.

U meze stanovitelnosti se hodnota kolísání linie vynásobí 10 a vydělí opět směrnici kalibrační křivky pro získání koncentrace.

Mez detekce pro kvercetin byla určena na $19 \cdot 10^{-5}$ mg/ml a mez stanovitelnosti na $63 \cdot 10^{-5}$ mg/ml.



Obr. 18 Odezva signálu slepého pokusu



Graf 7 Kalibrační křivka kvercetinu

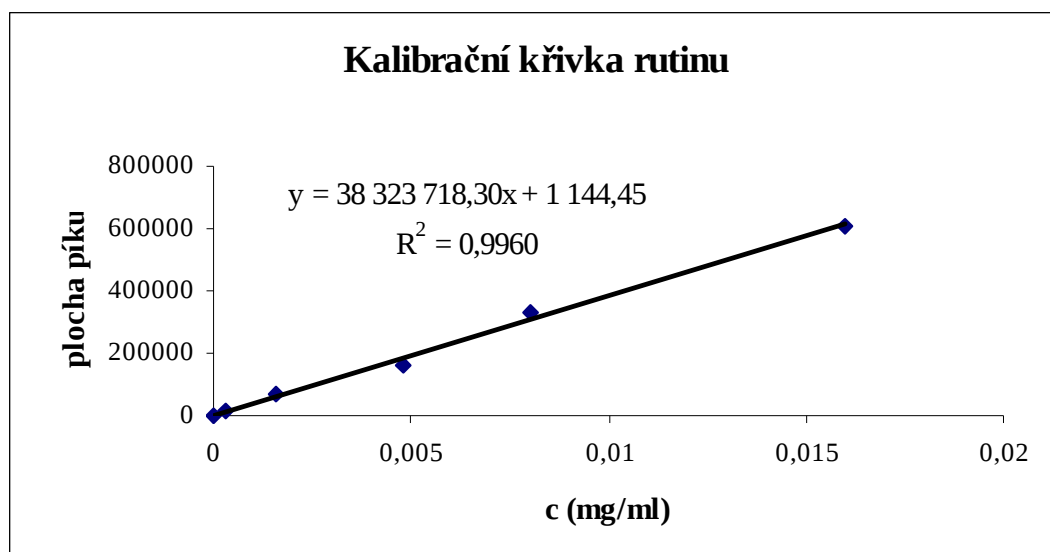
4.4 Kalibrační křivky

4.4.1 Rutin

Pro sestavení kalibrační křivky byly proměřovány hodnoty koncentrací 0,00032; 0,0016; 0,0048; 0,008 a 0,016 mg/ml. Výsledné retenční časy, plochy a výšky píků pro rutin jsou uvedené v Tab. 8. Z průměrných hodnot ploch píků byla sestavena kalibrační křivka jako graf závislosti plochy píků na koncentraci. Koncentrace rutinu je uvedena v 5 ml vzorku ředěného vodou v poměru 2:3 (MeOH: H₂O). Rovnice regrese pro výpočet koncentrace rutinu je $y = 38\,323\,718,30x + 1\,144,45$ (viz Graf 8)

Tab. 8 Průměrné hodnoty pro kalibrační křivku rutinu

C_{rutinu} (mg/ml)	retenční čas (min)	plocha píku	výška píku
0,00032	10,1	12742	744
0,0016	10,2	69928	4041
0,0048	10,1	162096	9278
0,008	10,1	330094	18988
0,016	10,1	609311	34605



Graf 8 Kalibrační křivka pro rutin

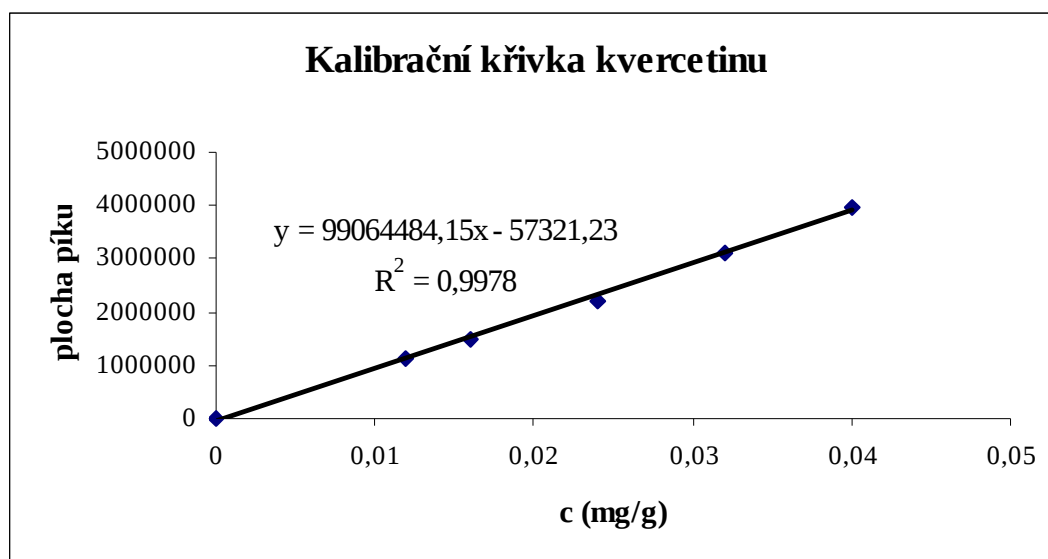
4.4.2 Kvercetin

Pro sestavení kalibrační křivky kvercetinu musel být použit vzorek standardu rozpuštěný ve 100% methanolu neředěný vodou. Při proměřování vzorků ředěných vodou nebylo možné dosáhnout požadované linearitu pro kalibrační křivku. Zřejmě totiž docházelo k degradaci kvercetinu v přítomnosti vody, proto byl použit vzorek rozpuštěný ve 100% methanolu, kde k těmto problémům nedocházelo.

Koncentrace proměřované na kalibrační křivku kvercetinů byly 0,012; 0,016; 0,024; 0,032 a 0,04 mg/ml. Tyto koncentrace jsou uvedeny pro vzorky kvercetinů rozpuštěné ve 100% methanolu. Výsledné hodnoty retenčních časů, ploch a výšek píků pro kvercetin jsou uvedeny v Tab. 9. Graf závislosti ploch píků na koncentraci byl sestaven z průměrných hodnot a výsledná rovnice regrese byla $y = 99\,064\,484\,15x - 57\,321,23$ (viz Graf 9.) Avšak z důvodů velké šířky píku kvercetinů byla pro stanovení koncentrace v reálných vzorcích použita kalibrační křivka sestavená jako závislost výšky píku na koncentraci kvercetinů ve vzorku, kde rovnice regrese byla $y = 1106132,18x - 78,34$ (viz kap. 4.3.2, Graf 7)

Tab. 9 Kalibrační křivka kvercetinů

C _{kvercetinů} (mg/ml)	retenční čas (min)	plocha píku	výška píku
0,012	23,7	9035	216
0,016	23,8	79259	1425
0,024	23,9	184557	3387
0,032	23,8	272609	5469
0,040	23,8	740592	17157



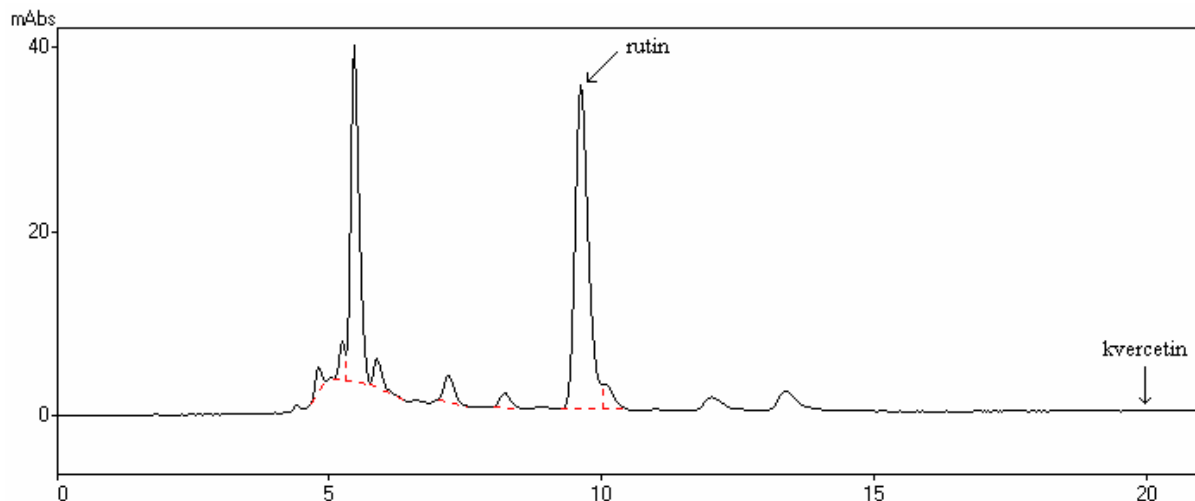
Graf 9 Kalibrační křivka pro kvercetin

4.5 Obsah látek v listech bezu černého

4.5.1 Rutin v listech

Rutin se stanovoval v pěti šlechtěných odrůdách bezu černého a v jedné plané. Listy se extrahovaly pomocí PSE methanolem za podmínek uvedených v kap. 3.6.1. Poté byly

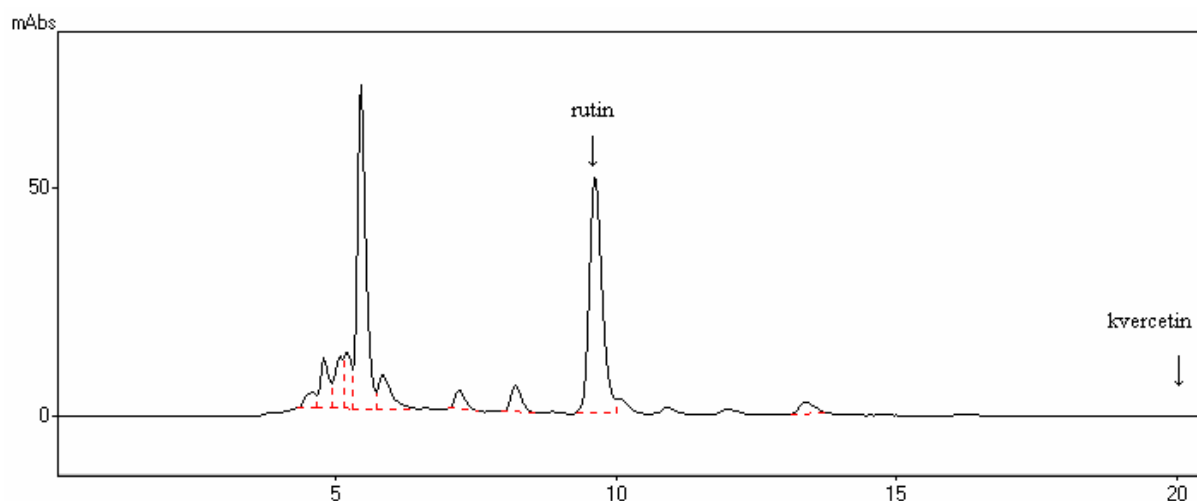
analyzovány vysoce účinnou kapalinovou chromatografií a detekovány při UV 360 nm. Na Obr. 19 je uveden výsledný chromatogram vzorku planého bezu černého, kde bylo analyzováno největší množství rutinu. V planém bezu černém, kde bylo stanoveno 4,09 mg/g, se nacházelo o dvě třetiny více tohoto flavonoidu než ve šlechtěných odrůdách. Ze šlechtěných druhů bylo nejvíce rutinu v odrůdě Haschberg, a to 1,41 mg/g, nejméně rutinu bylo v odrůdě Körsör, a to pouhých 0,13 mg/g.



Obr.19 Chromatogram vzorku listu planého bezu černého vyextrahovaného methanolem

Všechny vzorky byly extrahovány také pomocí PHWE vodou, aby výsledné hodnoty mohly být porovnány. Chromatogram získaný pro vzorek extrahovaný vodou je uveden na Obr. 20. Je srovnatelný s chromatogramem vzorku extrahovaného methanolem.

Stanovené hodnoty u extrakce vodou byly u planého bezu černého 5,58 mg/g, u odrůdy Haschberg 2,28 mg/g a u odrůdy Körsör, kde byl obsah rutinu nejnižší stejně jako u extrakce methanolem, pouze 0,13 mg/g.



Obr. 20 Chromatogram vzorku listu planého bezu černého vyextrahovaného vodou

Výsledné koncentrace byly vypočítané pomocí regresní rovnice určené z kalibrační křivky rutinu (kap. 4.4.1) a přepočítané na množství rutinu obsaženého v jednom gramu vzorku podle postupu uvedeného v kap. 3.6.4.3. Množství rutinu ve všech odrůdách při extrakci vodou nebo methanolem je uvedeno v Tab. 10 a Grafu 10.

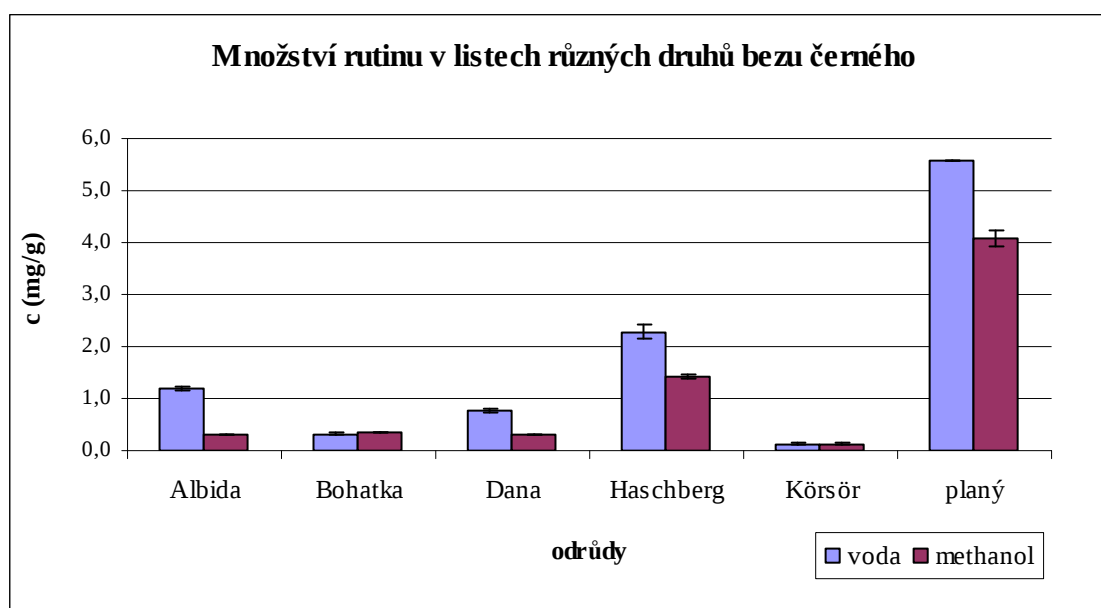
Při porovnání účinnosti extrakce pomocí PSE a PHWE, bylo větší množství získáno při extrakci vodou (PHWE) u odrůd Albida, Dana, Haschberg a u planého bezu černého. U *Sambucus nigra* Körsör byla výsledná koncentrace stejná při extrakci vodou i methanolem a u *Sambucus nigra* Bohatka byla dokonce hodnota rutinu nižší při extrakci vodou. Tyto rozporuplné výsledky mohly být způsobeny používáním ne plně automatizovaného přístroje PHWE, kdy docházelo občas ke špatnému odtoku extraktu z extrakční cely. Voda způsobovala bobtnání listů v extrakční cele a docházelo k vytváření hůře propustné vrstvy, přes kterou se extrakt špatně dostával z extrakční cely do vialky. I přesto pro získání výsledků více odpovídajícím skutečnému množství rutinu v rostlinách je vhodnější extrakce vodou.

Obsah rutinu v listech mohl být také ovlivněn vegetačním obdobím, ve kterém byly vzorky sbírány. Šlechtěné odrůdy byly sbírány na konci vegetačního období naopak planá odrůda byla sbírána o 2 měsíce dříve. To může být důvod, proč obsahovala větší množství rutinu než ostatní. Podle článku [21] je obsah rutinu v rostlinách ovlivněn působením UV záření, proto by bylo nejvýhodnější využívat rostliny na vrcholu vegetačního období.

Množství rutinu v listech bezu černého je v porovnání s významnými zdroji tohoto flavonoidu vysoké (viz kap.2.2.5.1). Podle studií zaměřených na stanovení rutinu ve významných zdrojích bylo největší množství získáno z „tartary“ pohanky (*Fagopyrum tataricum* (L) Gaertn) a šlo o 81 mg/g. Bylo však uvedeno, že jde o množství 300x vyšší než bylo stanoveno u běžných odrůd. Proto lze listy bezu černého považovat za potenciálně významný zdroj rutinu. [22] Rutin by bylo možné použít pro výrobu doplňků stravy. Případně by bylo možné ho izolovat z přírodních zdrojů a dodávat do potravin pro jejich obohacení o významný antioxidant a látku podporující permeabilitu a pružnost kapilár.

Tab. 10 Naměřené hodnoty pro rutin

odrůdy	extrakce methanolem		extrakce vodou	
	plocha píku	c (mg/g)	plocha píku	c (mg/g)
Dana	48384	0,31	183564	1,19
Bohatka	52957	0,34	36859	0,31
Albida	48206	0,31	71368	0,77
Haschberg	217601	1,41	337759	2,28
Körsör	21250	0,13	20362	0,13
planý	627585	4,09	856136	5,58



Graf 10 Porovnání obsahu rutinu v listech různých druhů bezu černého

4.5.2 Kvercetin v listech

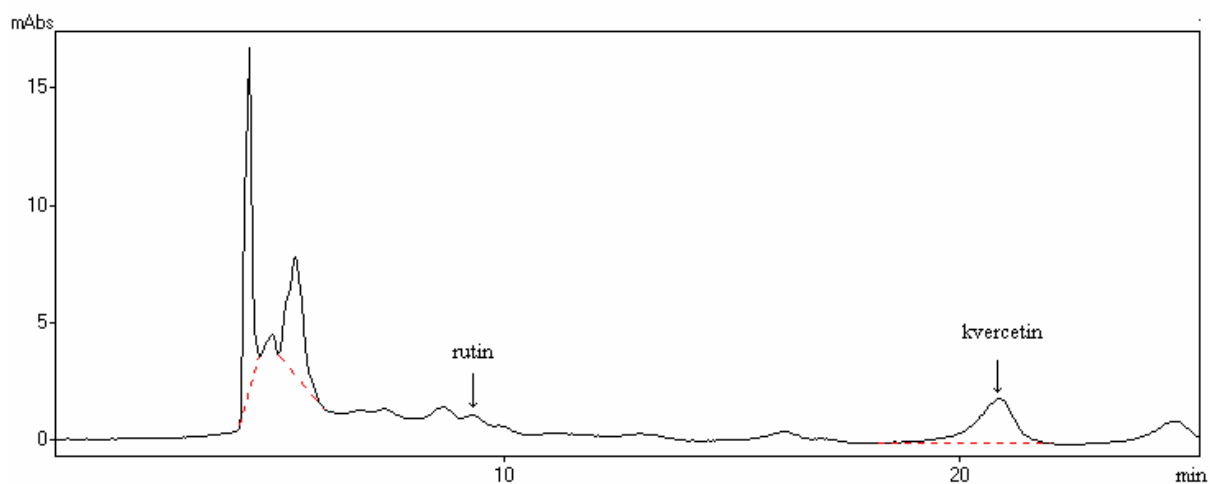
Flavonoid kvercetin nebyl v listech detekován používanou metodou HPLC s DAD, a to ani při extrakci vzorků listů pomocí methanolu ani při extrakci vodou. Pokud se v listech kvercetin vyskytoval, jeho množství bylo pod mezí detekce pro danou metodu. Musela by se tedy pro jeho detekci využít citlivější metoda, která by možnou přítomnost kvercetinu potvrdila. Nebo případně je možné, že obsah kvercetinu, stejně jako u rutinu, závisí na vegetačním období rostliny. Kvercetin by mohl být v listech obsažen v detekovatelném množství na vrcholu vegetačního stádia rostliny.

4.6 Obsah látek ve větvíčkách bezu černého

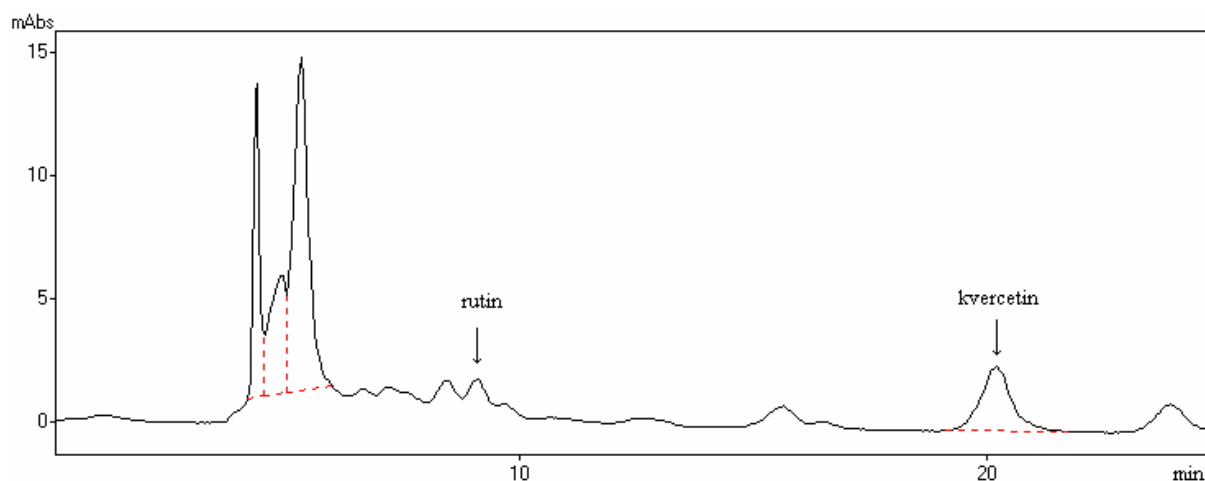
Po optimalizaci podmínek pro extrakci kvercetinu byla vybrána ideální teplota pro extrakci vodou 100 °C a pro extrakci methanolem 120 °C. Pro rutin byla teplota pro extrakci vodou i methanolem shodná, a to 120 °C. Bohužel kvůli malému množství dostupných vzorků šlechtěných odrůd musely být zvoleny pouze jedny podmínky pro extrakci větvíček.

Při srovnání vyextrahovaného množství kvercetinu i rutinu byla jako vhodnější extrakční rozpouštědlo zvolena voda, což je viditelné i při porovnání velikosti píků v chromatogramech na Obr. 21 a Obr. 22. Optimální teploty pro extrakci vodou se u obou látek lišily. Proto musela být vybrána látka, která byla ve větvíčkách ve větším množství. Vzhledem k vyextrahovanému množství rutinu a kvercetinu byl vybrán jako stěžejní stanovovaná látka ve větvích kvercetin, kterého bylo detekováno z plané odrůdy 0,25 mg/g. Rutinu bylo v planém bezu černém pouze 0,07 mg/g.

Vzorky šlechtěných odrůd *Sambucus nigra* byly získány z mladých rostlinek, proto nebylo k dispozici větší množství vzorku pro extrakci vhodnou zvláště pro kvercetin a pro rutin.



Obr. 21 Chromatogram vzorku větvíčky planého bezu černého, extrakce methanolem



Obr. 22 Chromatogram vzorku větvičky planého bezu černého, extrakce vodou

4.6.1 Kvercetin ve větvičkách

Po extrakci vodou při 100 °C byl v pěti extraktech větvíček šlechtěných odrůd bezu černého stanovován kvercetin, u kterého se předpokládalo, že je v těchto částech rostliny ve vyšším množství než rutin. Po analýze bylo však u některých odrůd zjištěno nedetekovatelné množství kvercetinu. U odrůd Albida, Dana a Haschberg nebyl kvercetin vůbec stanoven používanou metodou HPLC. Odrůdy Bohatka a Körsör obsahovaly kvercetin v množství menším než 0,05 mg/g vzorku. V porovnání s obsahem tohoto flavonoidu v plané odrůdě, kde se nacházelo 0,25 mg/g, jde o množství nejméně 5x nižší. (viz Graf 11)

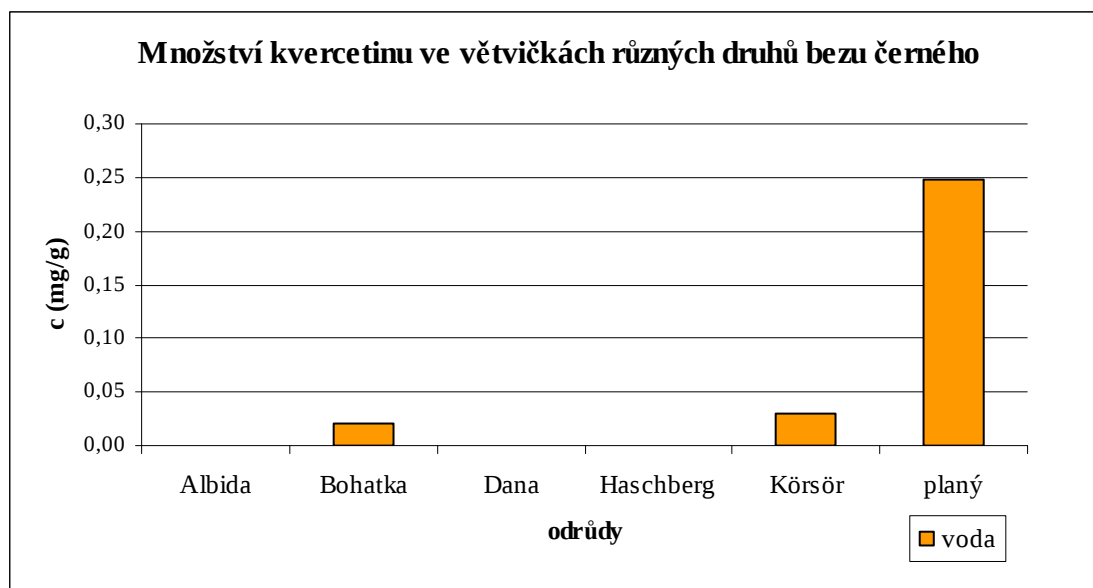
Tyto výsledné hodnoty (viz přílohy Tab. 1) by mohly být způsobeny různým stářím rostlin, ze kterých byly vzorky získávány. U planého bezu černého byl vzorek odebrán z keře, který byl již vzrostlý do výšky cca. 3 m.. Naopak u šlechtěných odrůd byly vzorky odebrány z mladých rostlin vstupujících do druhého vegetačního roku. Větvičky mladých rostlin byly křehčí a barvu měly trochu nazelenalou. U plané odrůdy byly použity již pevnější větvičky s barvou tmavě šedou. Lze tedy předpokládat, že stáří rostliny má také vliv na obsah látek v rostlině.

Vzorky byly také sbírány v jiném ročním období, tedy v jiné fázi vegetačního období rostliny. Planá odrůda byla odebrána na konci vegetačního období a šlechtěné odrůdy na jeho začátku, což by samozřejmě také mohlo mít vliv na obsah kvercetinu ve větvičkách bezu černého.

V porovnání s významnými zdroji jako je cibule nebo jablka je obsah kvercetinu ve větvičkách černého bezu celkem v nevýznamné množství. V uvedených zdrojích je ale zmiňován celkový obsah kvercetinu, tedy i molekuly vázané v jeho glykosidech. Obsah kvercetinu vázaného v glykosidech nebyl v této diplomové práci kvantifikován, protože samotná molekula kvercetinu je toxická pro lidský organismus. Do těla je většinou vstřebávána právě v podobě některého z glykosidů a poté se projevuje svými zdraví prospěšnými účinky.

Skutečnost výskytu volné molekuly kvercetinu ve větvích bezu černého by se dala využít spíše v zemědělství třeba na výrobu biopotravin proti škůdcům. Flavonoidy, včetně

kvercetin, chrání rostliny před napadením viry, bakteriemi a plísněmi (viz kap. 2.2.2). Při extrakci pomocí metody PHWE se jako rozpouštědlo používá voda, která není pro přírodu škodlivá v porovnání s organickými rozpouštědly. Získal by se tedy extrakt, u kterého se předpokládá ekologická nezávadnost. Tento extrakt by obsahoval kvercetin a další získané flavonoidy chránící rostliny před napadením plísněmi, bakteriemi nebo viry. Dalo by se tedy uvažovat o jeho využití jako ekologického postřiku na hospodářské plodiny. Samozřejmě by se musela provést studie, která by tuto skutečnost potvrdila.

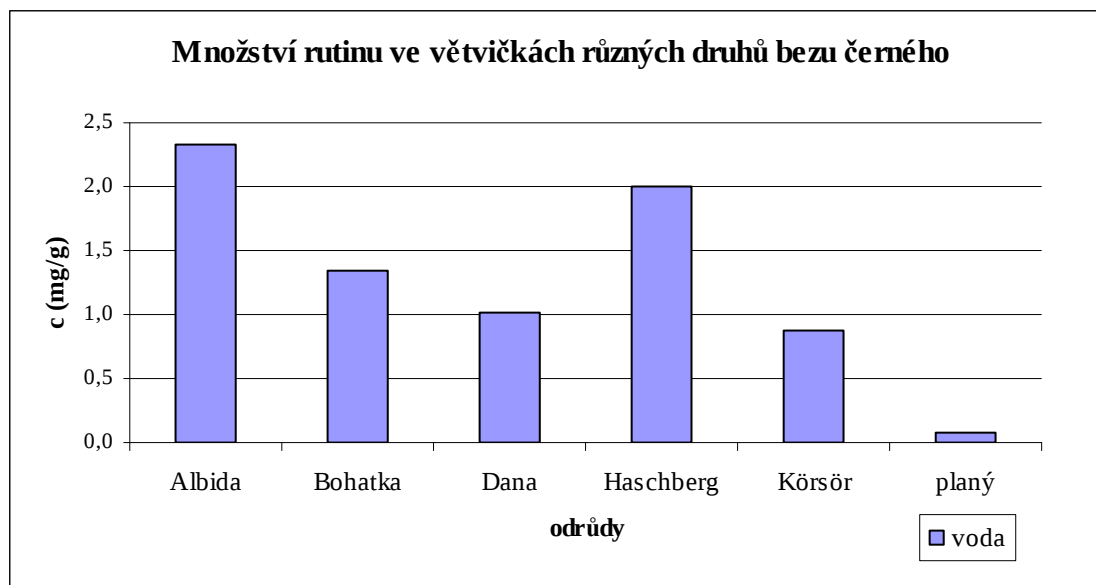


Graf 11 Porovnání obsahu kvercetinu ve větvíčkách různých druhů bezu černého

4.6.2 Rutin ve větvíčkách

I přes stanovený malý obsah rutinu v planém bezu černém bylo zjištěno významné množství rutinu ve šlechtěných odrůdách *Sambucus nigra*. Obsah rutinu v extraktu z větvíček šlechtěných druhů bezu černého (viz přílohy Tab. 1) je uveden v Grafu 12. Největší množství bylo detekované u *Sambucus nigra* Albida, kde se získalo 2,33 mg/g. V porovnání s významnými zdroji rutinu viz kap. 2.2.5.1 se dají větvíčky bezu černého stejně jako listy mezi ně zařadit. Samozřejmě, jak již bylo zmíněno v kap. 4.5.1, obsah rutinu je ovlivněn působením UV záření na rostlinu. Dalo by se předpokládat, že množství rutinu by bylo ještě vyšší, kdyby se vzorky větví sbíraly na vrcholu vegetačního období u rostliny.

Po izolaci rutinu z větvíček a jeho přečištění by mohl být využit pro potravinářské účely jako významná farmakologicky a biologicky účinná látka. Byla by tu tedy možnost využití odpadního materiálu ze zemědělství na výrobu zdraví prospěšných doplňků stravy.



Graf 12 Porovnání obsahu rutinu ve větvíčkách různých druhů bezu černého

5 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo stanovit množství vybraných flavonoidů, rutinu a kvercetin, ve šlechtěných odrůdách bezu černého a porovnat výsledné hodnoty s významnými zdroji těchto látek. Srovnávaly se šlechtěné bezy černé z důvodů snahy zakládat sady se šlechtěnými odrůdami této rostliny pro potravinářské využití plodů, květů, případně i ostatních částí rostliny.

Flavonoidy byly získávány a určovány v méně používaných částech rostliny, v listech a větvičkách bezu černého. Byly vybrány kvůli snaze využít odpadní materiál jako zdroj zdraví prospěšných látek. V potravinářském průmyslu by mohl být rutin přidáván např. do doplňků stravy. Naopak kvercetin by bylo možné využít v zemědělství jako postřik proti mikrobům, protože se projevuje antimikrobiálními účinky. Obě tyto látky jsou silnými antioxidačními činidly, proto by bylo možné je dále studovat i pro možné využití v boji proti rakovině.

V experimentální části musely být prvně optimalizované podmínky pro extrakci listů a větví pomocí PSE a PHWE. Jako účinnější metoda extrakce byla celkově PHWE, kterou se ve většině případů získalo (v porovnání s extrakcí pomocí PSE) více rutinu i kvercetin. Extrakce horkou vodou nebyla plně automatizována, proto docházelo výjimečně k menším problémům s odtokem extraktu z cely do vialky. Tento problém nastal u listů bezu černého, bylo proto potřeba vzorek prokládat inertními kuličkami, aby nedošlo k vytvoření nepropustné vrstvy z nabobtnaných listů. Optimální podmínky pro extrakci rutinu z matrice listů bezu černého byly stanovené na 3 cykly po 5 minutách, tlak 150 barů a teplota u extrakce vodou 80 °C, u extrakce methanolem 120 °C. Pro extrakci větvíček bezu černého byla optimální teplota u PSE methanolem 120 °C pro rutin i kvercetin, u PHWE vodou 100 °C pro kvercetin a 120 °C pro rutin.

Podmínky pro analýzu pomocí HPLC s DAD bylo potřeba také optimalizovat. Jako mobilní fáze se použila směs MeOH: H₂O: HCOOH v poměru 36: 61,5: 2,5 (pH v rozmezí 2,17-2,27), průtok eluentu byl nastaven na 0,7 ml/min. Používala se kolona SUPELCOSILTM LC-8DB o rozměrech 250 x 4,6 mm s velikostí částic sorbentu 5μm. Nastavená teplota na koloně byla 30°C.

Byl srovnáván obsah rutinu a kvercetin u pěti šlechtěných odrůd bezu černého Albida, Bohatka, Dana, Haschberg, Körsör a v jedné plané odrůdě.

V listech bezu černého byl stanoven pouze rutin, kvercetin nebyl detekován. Účinnější byla extrakce vodou, kterou se získalo vyšší množství rutinu, proto dále uvedené hodnoty jsou pro vzorky extrahované vodou. Nejvyšší množství rutinu bylo v planém bezu, kde se stanovilo 5,58 mg/g. Ze šlechtěných odrůd byl nejbohatší na rutin *Sambucus nigra* Haschberg, který obsahoval 2,28 mg/g. Nejmenší množství tohoto flavonoidu se nacházelo v *Sambucus nigra* Körsör, kde bylo pouhých 0,13 mg/g.

Ve větvičkách bezu černého se stanovily obě tyto látky. Extrakce vodou byla také účinnější než extrakce methanolem. Vzhledem k malému množství dostupných vzorků na extrakci musely být vybrány nejvhodnější podmínky. Optimalizace byla provedena na planém bezu černém, kterého bylo k dispozici nejvíce. Ze získaných výsledků byly pro extrakci vybrané optimální podmínky pro extrakci kvercetin vodou, protože kvercetin byl ve větvičkách planého bezu obsažen ve vyšším množství než rutin. Po proměření vzorků šlechtěných odrůd bylo zjištěno minimální množství kvercetin u odrůd *Sambucus nigra* Bohatka a Körsör. U *Sambucus nigra* Albida, Dana a Haschberg nebyl kvercetin vůbec

detekován. Získané hodnoty ukazují, že nejvyšší množství kvercetinů bylo tedy v plané odrůdě bezu černého, kde bylo 0,25 mg/g. Naopak rutin, který byl v plané odrůdě v setinách miligramů, se ve šlechtěných bezech nacházel ve významném množství. Nejvyšší množství rutinu bylo detekováno v *Sambucus nigra* Albida, kde byly 2,33 mg/g. Nejnižší množství ze šlechtěných druhů bylo v druhu Körsör, 0,87 mg/g.

Po srovnání s významnými zdroji těchto flavonoidů by se daly větve i listy zařadit mezi ně, protože stanovené množství je téměř srovnatelné. Dokonce by se dalo říct, že bez černý by mohl být jedním z nejvýznamnějších zdrojů těchto látek, kdyby se množství těchto látek zjišťovalo na vrcholu vegetačního období rostliny, kdy by mělo být zastoupení těchto látek nejvyšší. Rutin z těchto zdrojů by se dal využít v potravinářském průmyslu na výrobu doplňků stravy nebo jako látka obohacující potraviny o významný antioxidant. .

Kvercetin se podle dosavadních studií projevuje jako farmakologicky a biologicky velmi účinná látka, která je považována za jednu z nejsilnějších protirakovinných látek. Rostliny si kvercetin samy vytvářejí, protože je chrání před napadením mikroflórou. Bylo by zajímavé provést studii, jak působí extrakt získaný pomocí PHWE obsahující kvercetin na mikroby. Pokud by byl na mikroby účinný, způsoboval jejich úhyn a zároveň nijak neovlivňoval růst rostliny, dal by se využít jako postřik v ekologickém zemědělství.

6 Odkazy

- [1] VYMAZAL, Miloš. *Garten.cz* [online]. 2001 [cit. 2010-04-22]. Sambucus nigra – bez černý | rostliny / keře listnaté opadavé. Dostupné z WWW: <http://www.garten.cz/a/cz/2659-sambucus-nigra-bez-cerny/>. ISSN 1803-0033
- [2] *Www.celostnimedica.cz* [online]. 2004 [cit. 2010-04-22]. Bez černý (Sambucus nigra). Dostupné z WWW: <http://www.celostnimedica.cz/bez-cerny-sambucus-nigra.htm>.
- [3] *Foto-tapety.cz* [online]. 2006, 16.02.2010 [cit. 2010-04-22]. Tapety na plochu-obrázky-wallpapers. Dostupné z WWW: <http://www.foto-tapety.cz/images/1280/rostliny/bez-cerny-ker.jpg>.
- [4] BEŇADIK, Petr. *BOTANY.cz* [online]. 2007 [cit. 2010-04-22]. SAMBUCUS NIGRA L. - bez černý/baza cierna. Dostupné z WWW: <http://botany.cz/cs/sambucus-nigra/>.
- [5] *Bylinky.abecedazdravi.cz* [online]. 2005 [cit. 2010-04-22]. BEZ ČERNÝ – SAMBUCUS NIGRA | Abeceda Zdraví .cz:. Dostupné z WWW: <http://bylinky.abecedazdravi.cz/bez-cerny-sambucus-nigra>.
- [6] VELGOSOVÁ, M.; VELGOS, Š. *Naše Liečivé Rastliny*. Bratislava : Slovenské pedagogické nakladateľstvo, 1988. 351 s. ISBN 067-027-88.
- [7] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 3.* . Tábor : OSSIS, 2002. 368 s. ISBN 80-86659-02-X.
- [8] IWASHINA, Tsukasa, The Structure and Distribution of the Flavonoids in Plants. *Journal of Plant Research*. 2000, 113, s. 287-299.
- [9] *Www.agris.cz* [online]. 28.03.2000 [cit. 2010-04-22]. Agris : agrární www portál:. Dostupné z WWW: <http://www.agris.cz/vyhledavac/detail.php?id=83280&iSub=518>.
- [10] WINKEL-SHIRLEY, Brenda, Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. *American Society of Plant Physiologists*, 2001, 126, s. 485-493
- [11] MORICE, Philips C.; WOOD, Sharon G.; DUTHIE, Garry G., High-performance liquid chromatographic determination of quercetin and isorhamnetin in rat tissues using b-glucuronidase and acid hydrolysis, *Journal of Chromatography B*, 2000, 738, s. 413 – 417
- [12] ISHII, Kazuo; FURUTA, Takashi; KASUYA, Yasuji; High-performance liquid chromatographic determination of quercetin in human plasma and urine utilizing solid-phase extraction and ultraviolet detection, *Journal of Chromatography B*, 2003, 794, s. 49 – 56
- [13] JUSTESEN, Ulla; KNUTHSEN, Pia; LETH, Torben, Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection, *Journal of chromatography*, 1998, 799, s. 101-110
- [14] MANACH, Claudine, M.Sc., et al. Bioavailability, metabolism and Physiological impact of 4-oxo-flavonoids, *Elsevier Science Inc.*; 1996, Vol. 16, No. 3, s. 517-544

- [15] HOLLMAN, Peter CH; ARTS, Ilja CW, Review Flavonols, flavones and flavanols – nature, occurrence and dietary burden, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2000, 80, s. 1081-1093
- [16] *Www.phytochemicals.info* [online]. [cit. 2010-04-22]. Phytochemicals:. Dostupné z WWW: <<http://www.phytochemicals.info/>>.
- [17] *Www.phytochemicals.info* [online]. [cit. 2010-04-22]. Quercetin:. Dostupné z WWW: <<http://www.phytochemicals.info/phytochemicals/quercetin.php>>
- [18] *Www.darius.cz* [online]. 2009 [cit. 2010-04-22]. Aronie:. Dostupné z WWW: <http://www.darius.cz/archeus/cibule_cesnek_por.html>
- [19] HOLLMAN, Peter C.H., et al., Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man, *Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters*, 1997, 418, s. 152-156
- [20] KUNTIC, Vesna, et al., Isocratic RP-HPLC method for rutin determination in solid oral dosage forms, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007, 43, s. 718–721
- [21] KREFT, Samo; ŠTRUKELJ, Borut; GABERŠČIK, Alenka; KREFT, Ivan; Rutin in buckwheat herbs grown at different UV-B radiation levels: comparison of two UV spectrophotometric and an HPLC Metod, *Journal of Experiment Botany*, 2002, Vol.53, No. 375, s. 1801-1804
- [22] STEADMAN, Kathryn J, et al., Minerals, phytic acid, tannin and rutin in buckwheat seed milling fractions, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2001, 81, s. 1094-1100
- [23] KREFT, I.; FABJAN, N.; YASUMOTO, K., Rutin content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) food materials and products, *Food Chemistry*, 2006, 98, s. 508-512
- [24] Křečové-žily.cz [online].MeDitorial, 2009, 22.04.2010 [cit. 2010-04-25]. Bodyguard vašich cév. Dostupné z WWW: <<http://www.krecove-zily.cz/novinky/bodyguard-vasich-cev-87>>. ISSN 1803-0165.
- [25] MAULUDIN, Rachmat; MÜLLER, Rainer H.; KECK, Cornelia M., Development of an oral rutin nanocrystal formulation; *International Journal of Pharmaceutics*, 2009, 370, s. 202-209
- [26] *Www.phytochemicals.info* [online]. [cit. 2010-04-22]. Rutin:. Dostupné z WWW: <<http://www.phytochemicals.info/phytochemicals/rutin.php>>
- [27] KIM, Kyoung Heon, et al., Optima recovery of high-purity rutin crystal from the whole plant of *Fagopyrum esculentum* Moench (buckwheat) by extraction, fractionation, and recrystallization, *Bioresource Technology*, 2005, 96, s. 1709-1712
- [28] GRULICHOVÁ, Hana. Využití techniky PSE (extrakce rozpouštědlem za zvýšeného tlaku a teploty) v analýze potravin. Brno, 2008. 47 s. Bakalářská práce. VUT v Brně.
- [29] TEOA, Chin Chye, et al., Pressurized hot water extraction (PHWE), *Journal of Chromatography A*, 2010, 1217, s. 2484–2494
- [30] Guide to Solid Phase Extraction. Supelco : Bulletin 910 [online]. 1998, [cit. 2010-04-25]. Dostupný z WWW: <<http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>>.
- [31] DOČEKALOVÁ, Hana, prof., Přednášky z Instrumentální a strukturní analýzy, Brno, 2008/09, zimní semester, VUT v Brně

- [32] KLOUDA, Pavel. Moderní analytické metody. Ostrava : Pavel Klouda, 2003.
- [33] COUFAL, Pavel. Web.natur.cuni.cz [online]. 28.07.2004 [cit. 2010-04-25]. High Performance Liquid Chromatography, HPLC. Dostupné z WWW: <<http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>>.
- [34] HERTOOG, Michael G. L.; HOLLMAN, Peter C. H.; KAHN, Martijn B., Content of Potentially anticarcinogenic Flavonoids of 28 Vegetables and 9 Fruits Commonly Consumed in The Netherlands, *J. Agric. Food Chem.*, 1992, 40, s. 2379-2383
- [35] DEINEKA, V. I.; GRIGOREV, A. M.; STAROVEROV, V. M., HPLC analysis of flavonoids: determining rutin in plant extract, *Translated from Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*, 2004, Vol. 38, No. 9, s. 23-25
- [36] ISHII, Kazuo; FURUTA Takashi; KASUYA, Yasuji, High-performance liquid chromatographic determination of quercetin in human plasma and urine utilizing solid-phase extraction and ultraviolet detection, *Journal of Chromatography B*, 2003, 794, s. 49–56
- [37] KUNTIC, Vesna, et al., Isocratic RP-HPLC method for rutin determination in solid oral dosage forms, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007, 43, s. 718–721
- [38] ISHII, Kazuo; FURUTA, Takashi; KASUYA, Yasuji, Determination of rutin in human plasma by high-performance liquid chromatography utilizing solid-phase extraction and ultraviolet detection, *Journal of Chromatography B*, 2001, 759, s. 161-168
- [39] KREFT, N.; YASUMOTO, Fabjan, K., Rutin content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) food materials and products; *Food Chemistry*, 2006, 98, s. 508-512
- [40] MAULUDIN, Rachmat; MÜLLER, Rainer H.; KECK, Cornelia M., Development of an oral rutin nanocrystal formulation, *International Journal of Pharmaceutics*, 2009, 370, s. 202–209
- [41] BRETAG, Judith; KAMMERER, Dietmar R.; JENSEN, Uwe; CARLE, Reinhold, Adsorption of rutin onto a food-grade styrene–divinylbenzene copolymer in a model system, *Food Chemistry*, 2009, 114, s. 151–160
- [42] OLSZEWSKA, Monika, Separation of quercetin, sexanguletin, kaempferol and isorhamnetin for simultaneous HPLC determination of flavonoid aglycones in inflorescences, leaves and fruits of three *Sorbus* species, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2008, 48, s. 629–635
- [43] WANG, F.M.; YAO, T.W.; ZENG, S., Determination of quercetin and kaempferol in human urine after orally administrated tablet of ginkgo biloba extract by HPLC, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2003, 33, s. 317-321
- [44] SLADKOVSKÝ, Radek; SOLICH, Petr; OPLETAL, Lubomír, Simultaneous determination of quercetin, kaempferol and (E)-cinnamic acid in vegetative organs of *Schisandra chinensis* Baill. by HPLC, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2001, 24, s. 1049–1054
- [45] WACH, Anna; PYRZYŃSKA, Krystyna; BIESAGA, Magdalena, Quercetin content in some food and herbal samples, *Food Chemistry*, 2007, 100, s. 699–704
- [46] SUN, Ting; POWERS, Joseph R.; TANG, Juming, Loss of rutin and antioxidant activity of asparagus juice caused by a pectolytic enzyme preparation from *Aspergillus niger*, *Food Chemistry*, 2007, 105, s. 173–178

- [47] ZU, Yuangang; LI, Chunying; FU, Yujie; ZHAO, Chunjian, Simultaneous determination of catechin, rutin, quercetin kaempferol and isorhamnetin in the extract of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves by RP-HPLC with DAD, *Journal of Pharmaceutical and Biochemical Analysis*, 2006, 41, s. 714-719
- [48] LI, Wenkui; FITZLOFF, John F., High performance liquid chromatographic analysis of St. John's Wort with photodiode array detection, *Journal of Chromatography B*, 2001, 765, s. 99-105
- [49] CROZIER, Alan; LEAN, Michael E. J.; MCDONALD, Morag S.; BLAFL, Christine, Quantitative analysis of the Flavonoid Content of Commercial Tomatoes, Onions, Lettuce, and Celery, *J. Agric. Food Chem.*, 1997, 45, s. 590-595
- [50] STEADMAN, Kathryn J; BURGOON, Monica S; LEWIS, Betty A.; EDWARDSON, Steven E.; OBENDORF Ralph L., Minerals, phytic acid, tannin and rutin in buckwheat seed milling fractions, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2001, 81, s. 1094-1100
- [51] BENTHIN, Björn; DANZ, Henning; HAMBURGER, Matthias, Pressurized liquid extraction of medicinal plants, *Journal of Chromatography A*, 1999, 837, s. 211–219
- [52] Firemní vzdělávací materiály „Tips and Tricks of HPLC System, Troubleshooting“, Agilent Technologies, 2009
- [53] DOUŠA, Michal. Hplc.cz [online]. 1999, 05.03.2010 [cit. 2010-05-01]. Validační program pro statistické zpracování analytických dat. Dostupné z WWW: <<http://hplc.cz/>>.

POUŽITÉ ZKRATKY:

AcCN – acetonitril

CH₃COOH – kyselina octová

CZE – capillary zone electrophoresis, kapilární zónová elektroforéza

DAD – diode array detection, detekce diodovým polem

HCOOH – kyselina mravenčí

H₂O - voda

MeOH – methanol

MS – mass spectrophotometry, hmotnostní spektrometrie

PSE – pressurized solvent extraction, extrakce rozpouštědlem za zvýšeného tlaku a teploty

PHWE – pressurized hot water extraction, extrakce horkou vodou za zvýšeného tlaku a teploty

RP-HPLC – reverse phase high performance liquid chromatography, vysoce účinná kapalinová chromatografie na obrácené fázi

SPE – solid phase extraction, extrakce na pevné fázi

UV-VIS – ultrafialové a viditelné světlo

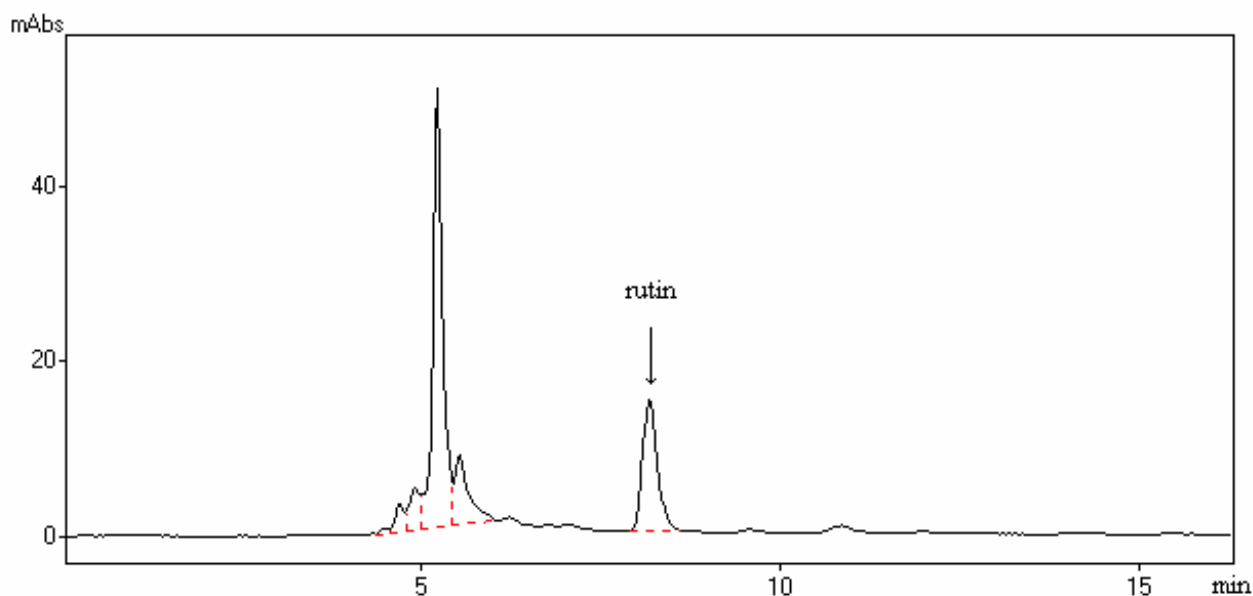
7 Přílohy

P 1 Obsah rutinu a kvercetin v různých druzích bezu černého	67
P 2 Chromatogram Sambucus nigra Haschberg z listu, extrakce methanolem.....	67
P 3 Chromatogram Sambucus nigra Körsör z listů, extrakce methanolem.....	68
P 4 Chromatogram Sambucus nigra Haschberg z listu, extrakce vodou.....	68
P 5 Chromatogram Sambucus nigra Körsör z listů, extrakce vodou.....	69
P 6 Chromatogram Sambucus nigra Albida z kůry, extrakce vodou	69
P 7 Chromatogram Sambucus nigra Körsör z kůry, extrakce vodou	70

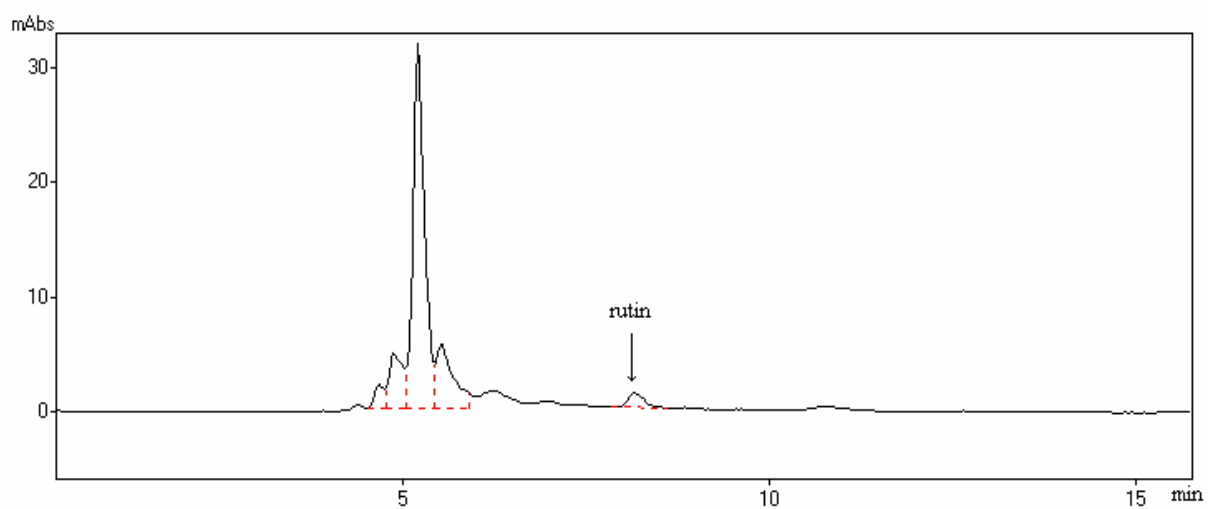
P 1 Obsah rutinu a kvercetin v různých druzích bezu černého

odrůdy <i>Sambucus nigra</i>	rutin (mg/g)	kvercetin (mg/g)
Albida	2.33	nd
Bohatka	1.35	0,02
Dana	1.02	nd
Haschberg	1.99	nd
Körsör	0.87	0.03
planý	0.07	0.25

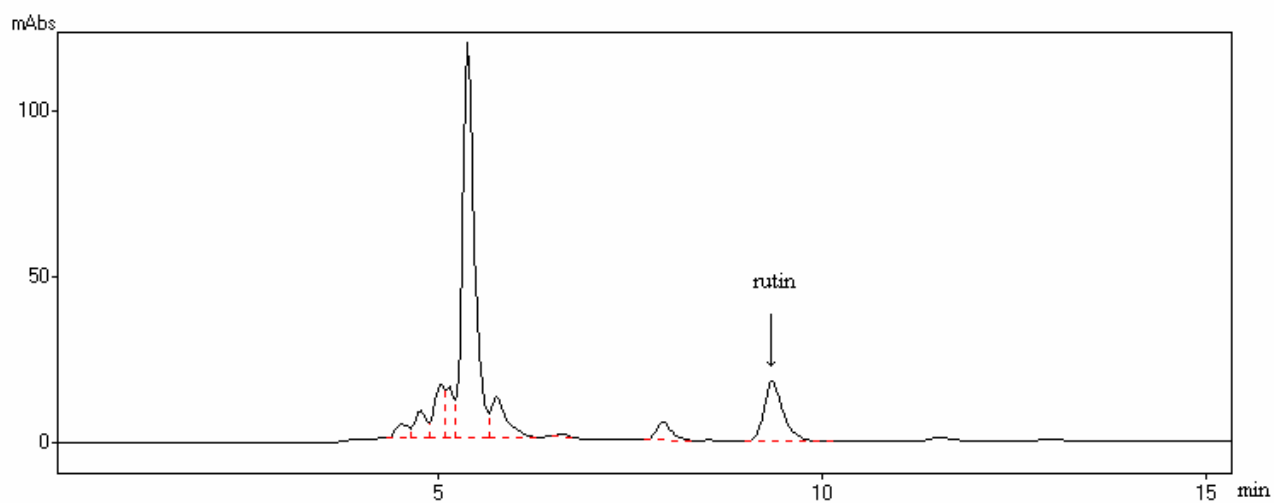
P 2 Chromatogram Sambucus nigra Haschberg z listu, extrakce methanolem



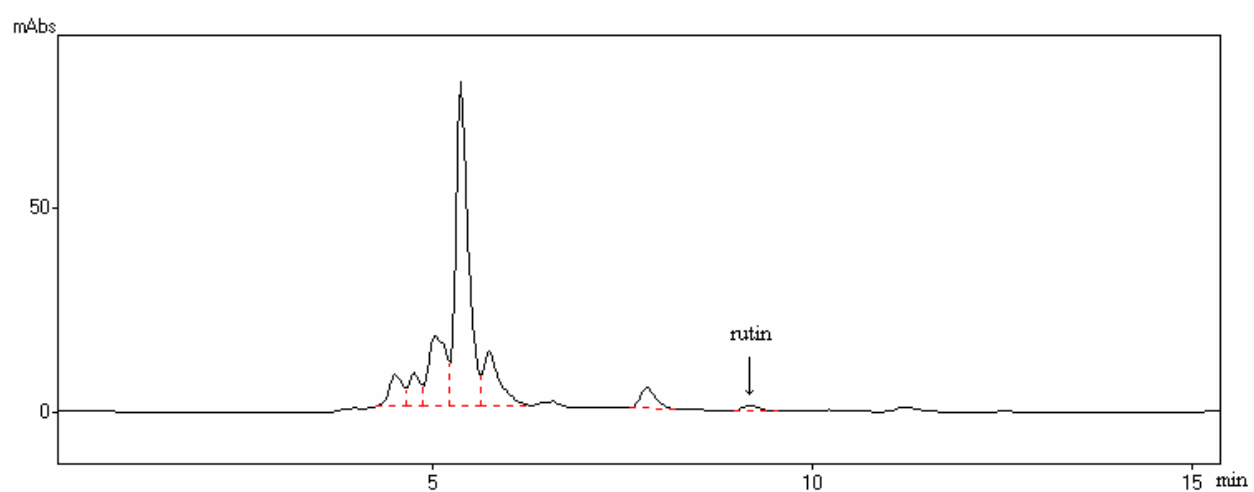
P 3 Chromatogram Sambucus nigra Körsör z listů, extrakce methanolem



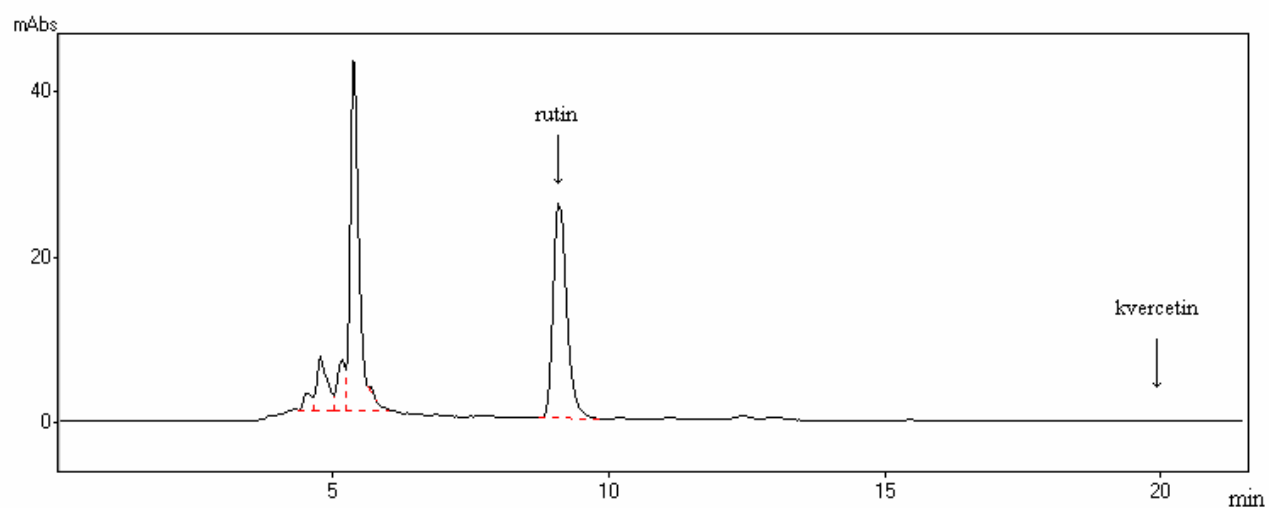
P 4 Chromatogram Sambucus nigra Haschberg z listu, extrakce vodou



P 5 Chromatogram Sambucus nigra Kösör z listů, extrakce vodou



P 6 Chromatogram Sambucus nigra Albida z kůry, extrakce vodou



P 7 Chromatogram Sambucus nigra Kórsör z kúry, extrakce vodou

