

**UNIVERZITA KARLOVA**

**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE**



**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Analýza nutričně významných látek v odpadních  
produktech ovocných stromů pomocí HPLC**

**Bc. KAROLÍNA ŠÍROVÁ**

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

**Konzultant: Mgr. Anežka Adamcová**

**HRADEC KRÁLOVÉ, 2020**

## **Poděkování**

Tato práce vznikla díky podpoře TAČR TJ02000196 a GAUK 1152120. Chtěla bych poděkovat Mgr. Anežce Adamcové za praktické vedení práce, vstřícné jednání, pomoc při měření a zpracovávání vzorků a cenné rady, které mi pomohly tuto práci zkompletovat a také vedoucímu práce doc. RNDr. Daliboru Šatínskému, Ph.D. za odborné rady a pomoc.

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

V Hradci Králové

Bc. Karolína Šírová

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Bc. Karolína Šírová

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

Konzultant: Mgr. Anežka Adamcová

Název: Analýza nutričně významných látek v odpadních produktech ovocných stromů pomocí HPLC

Tato diplomová práce se zabývá obsahem fenolických látek v různých částech stromů rodu *Pyrus*. V teoretické části je uvedena charakteristika majoritních fenolických látek hrušňi, jejich biosyntéza, chemické a biologické vlastnosti a možnosti stanovení těchto látek s využitím nejnovějších vědeckých studií. Praktická část obsahuje rozsáhlou analýzu rostlinného materiálu. Zabývá se stanovením fenolických látek (arbutinu, kyseliny chlorogenové, kyseliny 1,5- dikafeoylchinové, kyseliny 3,5- dikafeoylchinové a rutinu) v extraktech listí, kůry, pupenů a květů, dále pak v plodech a štěpce hrušňi pomocí vyvinuté a validované HPLC-DAD metody s následným stanovením celkové antioxidační aktivity pomocí FIA metody s elektrochemickou detekcí.

K analýze byla použita kolona ASCENTIS Express RP-Amide 150×4.6 mm, 2.7 μm. Byla využita gradientová eluce s mobilní fází tvořenou organickou složkou acetonitrilem (ACN) a vodnou složkou s 0,85% kyselinou fosforečnou (pH = 2,2). K detekci byl využit DAD detektor při vlnových délkách 220 nm, 327 nm a 354 nm. Teplota kolonového prostoru byla 30 °C, nástřik byl 1 μl (u plodů 5 μl) a průtoková rychlost mobilní fáze 1 ml/min.

Byl stanoven obsah fenolických látek ve 111 vzorcích dostupné biomasy z deseti odrůd ve třech obdobích. Obsah fenolických látek byl podstatně vyšší v odpadních produktech hrušňi oproti plodům. Dominantní složkou byl arbutin s kyselinou chlorogenovou.

## ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Bc. Karolína Šírová

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

Consultant: Mgr. Anežka Adamcová

Title of Diploma Thesis: Analysis of nutritionally important substances in fruit tree waste products by HPLC

This diploma thesis deals with the content of phenolic compounds in various parts of tree of the genus *Pyrus*. The theoretical part is focused on characterization, biosynthesis, chemical and biological properties of major phenolic compounds in pear-trees and the possibilities of their determination with the use of the latest scientific studies. The experimental part contains an extensive analysis of arbutin, chlorogenic acid, 1,5- dicaffeoylquinic acid, 3,5- dicaffeoylquinic acid and rutin in extracts of leaves, bark, buds, fruits, flowers and wood chip. Developed and validated HPLC-DAD method was used and the total antioxidant activity was determined by FIA method with electrochemical detection.

An ASCENTIS Express RP-Amide 150×4.6 mm, 2.7 μm analytical column and gradient elution consisting of organic part of acetonitrile (ACN) and water part with 0,85% phosphoric acid (pH = 2.2) were used for analysis. The detection was performed by DAD detector at wavelengths 220 nm, 327 nm and 354 nm. The temperature of column oven was 30 °C, injection volume was 1 μl (5 μl for fruit) and flow rate of mobile phase 1 ml/min.

The content of phenolic compounds in 111 samples of 10 different cultivars in three terms was determined. The content of phenolic compounds was higher in waste products than in fruits. Arbutin and chlorogenic acid were dominant phenolic compounds.

## OBSAH

ABSTRAKT.....	4
ABSTRACT.....	5
Obsah .....	6
1. POUŽITÉ ZKRATKY.....	9
2. ÚVOD .....	11
3. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE .....	12
4. TEORETICKÁ ČÁST.....	13
4.1 Biologie a morfologie hrušní.....	13
4.2 Fenolické látky vyskytující se v plodech a biomase hrušní .....	14
4.3 Syntéza fenolických látek.....	16
4.4 Vlastnosti fenolických látek .....	17
4.5 Arbutin .....	17
4.5.1 Arbutin jako typický marker hrušně .....	18
4.5.2 Použití při léčbě infekce močových cest.....	19
4.6 Kyselina chlorogenová .....	20
4.7 Rutin.....	22
4.8 Další látky v plodech .....	23
4.9 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	24
4.9.1 Kolona Ascentis Express RP-Amide.....	26
4.10 Stanovení antioxidantů .....	27

4.10.1	Průtoková injekční analýza .....	27
4.10.2	CoulArray detektor .....	28
4.11	Příklady předchozích studií stanovení fenolických látek v hrušních.....	30
5.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	34
5.1	Přístroje a podmínky separace .....	34
5.2	Chemikálie.....	34
5.3	Příprava směsného roztoku standardů.....	35
5.4	Postup extrakce fenolických sloučenin ze vzorků.....	35
5.4.1	Listy, kůra, pupeny, květy a štěpka.....	35
5.4.2	Plody .....	36
5.5	Validační parametry .....	36
5.6	Parametry chromatografické separace .....	37
5.7	Optimalizace extrakce plodů .....	37
5.7.1	Optimalizace délky ultrazvukové lázně a výběr rozpouštědla.....	37
5.7.2	Optimalizace množství kyseliny octové .....	38
5.8	Stanovení obsahu fenolických látek .....	39
5.8.1	Výpočet koncentrace fenolických látek v extraktech .....	40
5.8.2	Detekce a identifikace fenolických látek v extraktech .....	41
5.9	Stanovení celkové antioxidační aktivity.....	42
5.9.1	Přístroj a podmínky stanovení .....	42
5.9.2	Příklad grafického záznamu stanovení TAA.....	43
5.9.3	Optimalizace nástřiku při analýze extraktů plodů.....	43
6.	VÝSLEDKY .....	45
6.1	Obsah fenolických látek v jednotlivých odrůdách .....	45
6.1.1	‘Clapova’ .....	45

6.1.2	‘Konference’ .....	46
6.1.3	‘Williamsova červená’ .....	47
6.1.4	‘Williamsova’ .....	48
6.1.5	‘Charneuská’ .....	49
6.1.6	‘Lucasova’ .....	50
6.1.7	‘Higland’ .....	51
6.1.8	‘Grosdemange’ .....	52
6.1.9	‘Thiriotova’ .....	53
6.1.10	‘General Leclerc’ .....	54
6.1.11	Štěpka .....	55
6.1.12	Příklady chromatografického záznamu obsahu fenolických látek	56
6.2	Celková antioxidační aktivita v jednotlivých materiálech.....	59
6.3	Vztah celkového množství fenolických látek a TAA.....	60
7.	DISKUSE A ZÁVĚR.....	63
8.	SEZNAM TABULEK.....	66
9.	SEZNAM OBRÁZKŮ .....	68
10.	SEZNAM GRAFŮ .....	70
11.	POUŽITÁ LITERATURA .....	71



## 1. POUŽITÉ ZKRATKY

1,5-DCQA	kyselina 1,5- dikafeoylchinová
3-CQA	kyselina 3- kafeoylchinová
3,4-DCQA	kyselina 3,4- dikafeoylchinová
3,5-DCQA	kyselina 3,5- dikafeoylchinová
4-CQA	kyselina 4- kafeoylchinová
5-CQA	kyselina 5- kafeoylchinová
AA	kyselina octová
ACN	acetonitril
ANR	anthokyanidyn reduktáza
ANS	anthokyanidyn syntáza
BHT	butylhydroxytoluen
TFA	kyselina trifluoroctová
CHS	chalkonsynthasa
DAD	detektor s diodovým polem
DFR	dihydroflavonolreduktasa
ED	elektrochemický detektor
EI	elektrochemický index
ESI	ionizace elektrosprejem
F3H	flavanon-3-hydroxyláza
FIA	průtoková injekční analýza
FLS	flavonol syntáza
G6P	glukóza-6- fosfatáza
HCl	kyselina chlorovodíková
FA	kyselina mravenčí
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
MeOH	methanol
MF	mobilní fáze
MS	hmotnostní spektrometrie

NO	oxid dusný
PAL	fenylalaninamoniumlyasa
PDA	detektor s diodovým polem
PTFE	polytetrafluorethylen
Q-TOF	kvadrupól- analyzátor doby letu
RP	reverzní fáze
RSD	relativní směrodatná odchylka
SF	stacionární fáze
TAA	celková antioxidační aktivita
UF3GT	UDP-glukóza: flavonoid-3-O-glukosyltransferáza
UV	ultrafialové záření
VIS	viditelné záření

## 2. ÚVOD

Fenolické sloučeniny jsou nezbytnou součástí lidské výživy a jsou velmi důležité díky svým antioxidačním vlastnostem. Jsou to sekundární rostlinné metabolity, které tvoří jednu z nejběžnějších a nejrozšířenějších skupin látek v rostlinách. Dávají jedinečnou výraznou chuť ovoci a zelenině a mohou způsobovat barevné změny potravin.

Biomasa hrušně obsahuje pestré zastoupení fenolických sloučenin a antioxidantů. Ty mají protizánětlivé, antioxidační, antitusické, antidiabetické, antimikrobiální a diuretické účinky. V plodech je vysoký obsah vitamínů C, E, B komplexu a jsou velmi dobrým zdrojem vlákniny, mědi a draslíku. Hladina bílkovin a tuků je v plodech nízká. Zatímco složení plodu je známo, tato diplomová práce obsahuje cenné informace o zastoupení a množství fenolických látek v materiálu ovocného stromu. Tento doposud nevyužívaný zemědělský a hojně se vyskytující materiál by mohl sloužit jako zdroj cenných bioaktivních látek s uplatněním v kosmetickém či farmaceutickém průmyslu.

Ke stanovení fenolických látek je často využívána vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), která separuje jednotlivé fenolické látky a umožňuje jejich kvantifikaci. Tato metoda byla využita k analýze majoritních fenolických látek v biomase hrušně. V extraktech byla rovněž stanovena celková antioxidační aktivita pomocí průtokové injekční analýzy s elektrochemickou detekcí, jejichž výhodou je velmi rychlé meziodrůdové porovnání.

### 3. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části práce je charakteristika majoritních fenolických látek v biomase hrušní. Popsat jejich biosyntézu, chemické, biologické vlastnosti a možnosti stanovení těchto látek s využitím nejnovějších vědeckých studií.

Cílem praktické části je rozsáhlá analýza rostlinného materiálu a plodů hrušně. Zabývá se stanovením fenolických látek (arbutinu, kyseliny chlorogenové, kyseliny 1,5-dikafeoylchinové, kyseliny 3,5-dikafeoylchinové a rutinu) v extraktech listí, kůry, pupenů, květech, dále pak v plodech a štěpce hrušní pomocí vyvinuté a validované HPLC-DAD metody a následné stanovení celkové antioxidační aktivity. Cílem bylo určit měnící se fenolický profil dostupné biomasy v období srpen-září 2019, říjen-listopad 2019 a březen-duben 2020. Mezi sledované odrůdy patřily: 'Lucasova', 'Thirriotova', 'Grosdemange', 'Charneuská', 'Higland', 'Wiliamsova', 'Wiliamsova červená', 'Konference', 'Clapova' a 'General Leclerc'.

## 4. TEORETICKÁ ČÁST

### 4.1 *Biologie a morfologie hrušní*

Hrušeň patří do říše *Plantae*, podříše *Tracheobionta*, oddělení *Magnoliophyta*, třídy *Rosopsida*, řádu *Rosales*, čeledi *Rosaceae*, podčeledi *Amygdaloideae* a rodu *Pyrus* [1].

Existuje okolo 22-26 druhů hrušní. Všechny druhy jsou diploidní, najdou se ovšem i některé kulturní odrůdy, které jsou triploidní ('Lucasova', 'Dielova', 'Pastornice', 'Špínka' atd.) eventuelně tetraploidní (anglická odrůda 'Fertility' nebo 'jugoslávská Topka', taktéž byly nalezeny spontánní tetraploidní formy odrůdy 'Williamsova' a 'Anjou') [2].

V současné době je ve Státní odrůdové knize zapsáno 44 odrůd. Nejstarší evidovanou odrůdou je 'Williamsova' (pěstována přibližně od roku 1770). Odrůdy hrušní lze rozdělit podle zralosti. Odrůdy letní (např. 'Clapova', 'Williamsova' a 'Williamsova červená') konzumně dozrávají do 15. září a délka jejich konzumní zralosti je 14 dnů. Odrůdy podzimní (např. 'Konference' a 'Boscova lahvice') konzumně dozrávají od 15. září do 15. listopadu a délka jejich konzumní zralosti je 2-8 týdnů. Zimní odrůdy (např. 'Lucasova' a 'Anjou') konzumně dozrávají po 15. listopadu a délka jejich konzumní zralosti je 16 týdnů. Zimní odrůdy se mohou podle způsobu skladování ještě dále dělit na raně zimní (dozrávají v listopadu a prosinci), středně zimní (dozrávají v lednu a únoru) a pozdně zimní (dozrávají v březnu a dubnu) [2].

Odrůdy pěstované u nás jsou většinou cizosprašné, proto je výhodné vysazovat kombinaci dvou diploidních odrůd kvetoucích ve stejném termínu. Nejběžnějšími opylovači hrušní jsou včely. Pouze výjimečně se můžeme u hrušní setkat s pylovou inkompatibilitou (jako u jabloní), například u odrůd 'Williamsova' x 'Avranšská' [2].

Hrušně jsou stromy s opadavou korunou. Kůra je hladká nebo hluboce zvrásněná. Listy jsou uspořádané ve střídavém postavení s eliptickým až oválným tvarem, jsou hladké a lesklé (na začátku vegetace mohou být listy až tmavě načervenalé, jako například u odrůdy 'Williamsova červená'). Květy jsou bílé, velké, pravidelné a oproti květům

jabloní méně lákavé pro včely (kvůli nižší cukernatosti nektaru). Květ je tvořen pěti korunními lístky, jejichž vzájemné postavení slouží jako rozpoznávací znak odrůd [2].

Plody mají různě protáhlý hruškovitý tvar (japonské odrůdy mají kulovité plody), asijské odrůdy jsou po dozrání pevné, nemoučnatí, chruplavé a šťavnatější než evropské odrůdy, které jsou jemnější, máslovité a moučnatí. Barva se u různých odrůd liší (barevná variabilita plodů asijských hrušní je podstatně bohatší než u odrůd evropských) [2].

Nejčastější barvou je zelená, kterou mají odrůdy 'Anjou', 'Concorde' a 'Charneuská'. Zelenožlutou barvu mají plody odrůd 'Konference' a 'Thriotova', zlatohnědé až skořicové jsou plody 'Fertility', 'Packham's Triumph', 'Madame Verté' a 'Boscova lahvice'. Zelené s červeným nebo červeno-hnědým líčkem jsou odrůdy 'Durondeau', 'Grosdemange' a 'Seckel', až tmavě fialové jsou plody odrůd 'Cadcade', 'Red Anjou', 'Clappova červená' a 'Williamsova červená' [2].

## **4.2 Fenolické látky vyskytující se v plodech a biomase hrušní**

Fenolické sloučeniny jsou nezbytnou součástí lidské výživy a jsou velmi důležité díky svým antioxidačním vlastnostem. Tyto sloučeniny mají aromatický kruh nesoucí jednu nebo více hydroxylových skupin a jejich struktura se může pohybovat od struktury jednoduché fenolové molekuly po strukturu komplexního vysokomolekulárního polymeru. Antioxidační aktivita fenolických sloučenin závisí na struktuře, zejména na počtu a polohách hydroxylových skupin a povaze substitucí na aromatických kruzích [3].

Ve studii *Liaudanskas a kol. (2017)* byly stanovovány fenolické látky (kyselina chlorogenová, rutin, kvercetin-3-O-galaktosid, isokvercitrin, isorhamnetin rutinosid, kvercitrin, kvercitrin malonyl glukosid a isorhamnetin glukosid) v plodech 4 různých odrůd ('Konference', 'Concorde', 'Grabova' a 'Patten'). K extrakci byl použit 70% ethanol. Následovala ultrazvuková lázeň (15 minut, 60 °C) Extrakt byl filtrován přes filtrační papír (zbytek na filtračním papíru byl ještě dvakrát propláchnut 70% ethanolem) a následně filtrován přes membránový filtr s velikostí pórů 0,22  $\mu\text{m}$ . HPLC analýza prokázala nejvyšší zastoupení kyseliny chlorogenové [4].

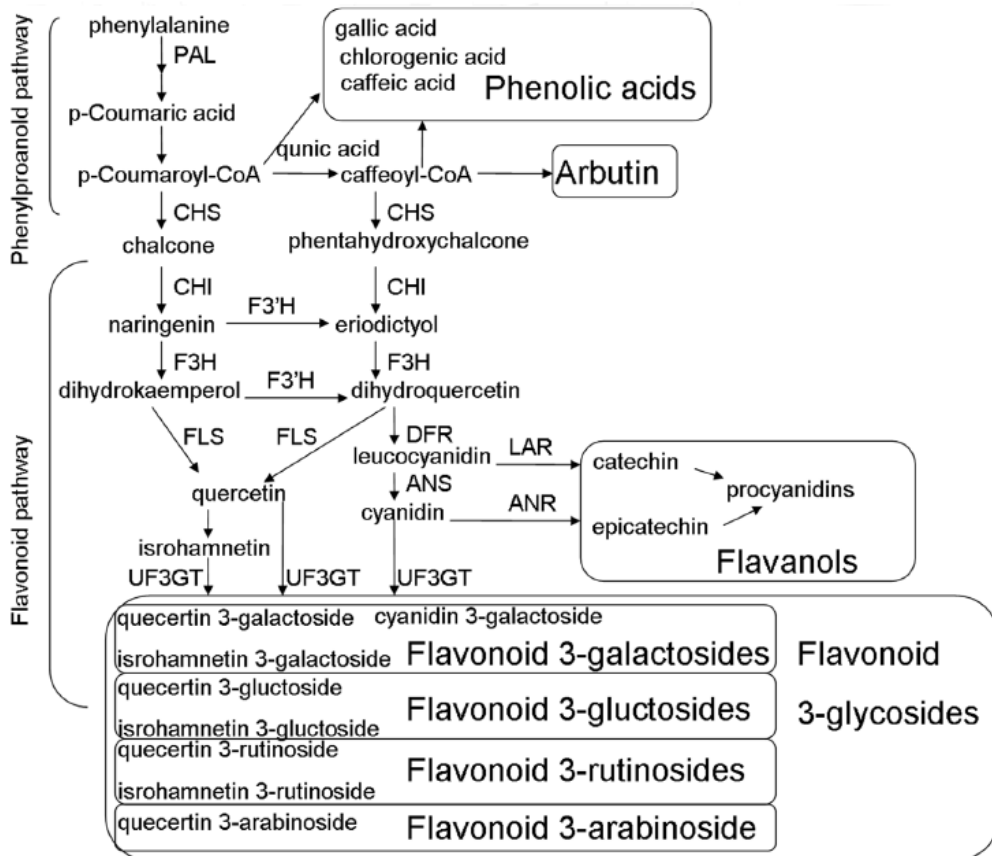
V další studii *Brahem a kol. (2017)* byla analyzována slupka a dužina 19 odrůd hrušní z hlediska fenolického složení. Lyofilizované vzorky byly přímo podrobeny extrakci nebo thioacidolýze. Pro thioacidolýzu byl přidán suchý methanol okyselený koncentrovanou HCl a toluen- $\alpha$ -thiol. Směs se inkubovala 30 minut při 40 °C (vortexována každých 10 minut) a následovalo chlazení na ledu pro zastavení thioacidolýzy. Lyofilizované vzorky pro přímou extrakci byly rozpuštěny methanolu okyseleném kyselinou octovou a následně uloženy do ultrazvukové lázně na 15 minut. Všechny vzorky byly filtrovány přes filtr PTFE 0,45  $\mu$ m. Fenolické sloučeniny byly identifikovány pomocí HPLC/ESI-MS<sup>2</sup> a jednotlivě kvantifikovány pomocí HPLC-DAD. Byl identifikován arbutin, derivát tryptofanu, kyselina 3- kafeoylchinová, dimery prokyanidinu, katechin, kyselina 5- kafeoylchinová, coumaroyl hexosid kyseliny jablečné, kyselina 4- kafeoylchinová, epikatechin, kyselina coumaroylchinová, kyanidin-3-O-hexosid, hexosid kyseliny syringové, peonidin-3-O-hexosid, kyselina kumarová, kvercetin-3-O-rutinosid, kvercetin-3-O-galaktosid, kvercetin-3-O-glukosid, di-O- kafeoylchinová kyselina, isorhamnetin-3-O-rutinosidy, isorhamnetin-3-O-hexosidy a isorhamnetin acetyl hexosidy. Nejvíce se vyskytovaly prokyanidiny a kyselina 5- kafeoylchinová. Ve slupce byl vyšší obsah než v dužině [5].

Existuje studie *Andreotti a kol. (2006)*, která se zabývá analýzou fenolických látek v listech šesti odrůd. Rostlinný materiál byl po lyofilizaci homogenizován. Byl extrahován methanolem obsahujícím flavon (vnitřní standard) a centrifugován při 10000  $\times$  g 10 minut při -10 °C. Byl identifikován arbutin, který tvořil majoritní složku. Dále pak deriváty arbutinu, hydroxyskořicová kyselina, chlorogenová kyselina, p-kumarová kyselina, deriváty kyseliny p-kumarové a flavonolové glykosidy [6].

V další studii autorů *Colaric a kol. (2007)* byly stanovovány fenolické látky v listech odrůdy 'Williamsova'. Vzorky byly homogenizovány a extrahovány methanolem obsahujícím 1% BHT (antioxidant) v ultrazvukové lázni chlazené ledem po dobu 45 minut. Následovala centrifugace při 12000  $\times$  g po dobu 7 minut při 10 °C a filtrace přes 0,45  $\mu$ m filtr. Metodou HPLC-DAD byly stanoveny kyselina kávová, kyselina chlorogenová, kyselina sinapová, kyselina syringová, kyselina vanilová, rutin, katechin a epikatechin. Nejvíce se vyskytovala kyselina chlorogenová, nejméně kyselina sinapová [7].

Ve studii *Bulduk a kol (2016)* byl stanovován arbutin v listech, kůře a plodech. Vzorčky byly extrahovány 50% methanolem v ultrazvukové lázni (40 minut) a následně filtrovány přes 0,45 µm membránové filtry. Největší obsah arbutinu byl v listech. V plodech bylo přibližně 40krát menší množství než v listech [8].

### 4.3 Syntéza fenolických látek



Obrázek 1 Schéma syntézy fenolických látek [9].

Syntéza fenolických látek v rostlinách je dobře známa (obr. 1). Fenylnalanin je prekurzorem syntézy mnoha polyfenolů a je enzymaticky přeměňován na flavonoidy prostřednictvím mnoha kroků. Enzymy účastníci se dráhy zahrnují fenylnalaninamoniumlyasu (PAL), chalkonsynthasu (CHS), flavanon-3-hydroxylázu (F3H), dihydroflavonolreduktasu (DFR), anthokyanidyn reduktázu (ANR), anthokyanidyn syntázu (ANS), flavonol syntázu (FLS) a UDP-glukóza: flavonoid-3-O-glukosyltransferázu (UF3GT) [9].



Syntéza fenolických látek má 2 části. První částí je syntéza fenypropanoidů. Fenypropanoidy jsou fenolové látky odvozené od fenyalaninu a tyrosinu. V rostlinném organismu jsou syntetizovány z kumarové kyseliny, která vzniká z fenyalaninu reakcí katalyzovanou enzymem fenyalaninamoniumlyasou (PAL). Kumarová kyselina se dále přeměňuje až na arbutin a fenolové kyseliny (kyselina galová, chlorogenová, kávová). Druhou částí je syntéza flavonoidů, jejichž konečným produktem jsou fenolové glykosidy, flavony a flavan-3-oly (rutin) [9].

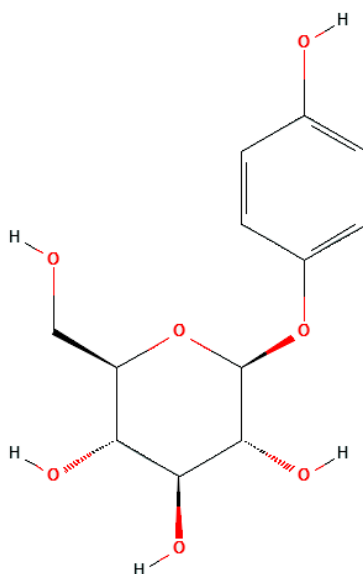
#### 4.4 Vlastnosti fenolických látek

Fenolické sloučeniny jsou sekundární rostlinné metabolity, které tvoří jednu z nejběžnějších a nejrozšířenějších skupin látek v rostlinách. Dávají jedinečnou výraznou chuť ovoci a zelenině a mohou způsobovat barevné změny potravin. Ukázalo se, že fenoly mají roli v hnědnutí, chuti a barevných vlastnostech ovoce a získaných produktů. Fenolické látky také hrají roli v ochraně rostlin a metabolismu lidského zdraví [10].

#### 4.5 Arbutin

Molekulový vzorec:  $C_{12}H_{16}O_7$

MW: 272,25 g/mol [11].



Obrázek 2 Strukturální vzorec arbutinu [11].

Arbutin (4-hydroxyfenyl- $\beta$ -D-glucopyranosid) je hydrochinonová sloučenina se dvěma epimery,  $\alpha$  a  $\beta$  arbutinem. Je chemicky stabilní a může být vyroben synteticky nebo může být získán z rostlin a vykazuje antioxidační aktivitu. Zdroje  $\alpha$ -arbutinu a  $\beta$ -arbutinu jsou zcela odlišné.  $\beta$ -arbutin může být připraven extrakcí rostlin a umělou syntézou.  $\alpha$ -arbutin se obecně připravuje různými mikrobiálními enzymy [12].

Arbutin může účinně inhibovat aktivitu tyrosinázy v kožních buňkách ( $\alpha$ -arbutin je silnějším inhibitorem) a blokovat tak tvorbu melaninu, aniž by ovlivnil buněčnou proliferaci. Kromě toho by mohl urychlit rozklad a vylučování melaninu, a tím snížit pigmentaci kůže a eliminovat pihy. Díky této své vlastnosti se používá hlavně v kosmetických přípravcích, například jako součást krémů pro zesvětlení kůže. Vzhledem k tomu vzrůstá množství výzkumů, které se zabývají účinky arbutinu při vyrovnání nestejného odstínu pleti. Výzkum ukázal, že syntetická verze, chemicky známá jako deoxyarbutin, je pro rozjasnění účinnější než přírodní derivát [12].

Arbutin je navíc hlavní součástí přípravků pro léčbu popálenin a opaření. Vyznačuje se rychlým odstraněním bolesti a otoků. Urychluje hojení a nezanechává žádné jizvy a může zmírnit i akné. Má baktericidní a protizánětlivé účinky. Může ulevit od kašle a astmatu. Navíc také nevykazuje žádnou toxicitu, podráždění, senzibilizaci a jiné vedlejší účinky. V hruškách působí jako antibiotická látka v odolnosti proti bakteriální spále růžovitých (způsobena bakterií *Erwinia amylovora*) [10,12].

#### **4.5.1 Arbutin jako typický marker hrušně**

Falšování potravin je problém, který může mít negativní dopady na spotřebitele i na poctivé výrobce. Běžnými cíli jsou výrobky z ovoce, jako jsou džusy a džemy. Jednou z metod falšování ovocné šťávy je nehlášené přidávání levnější šťávy ke šťávě dražší. Příkladem jsou jablečné a hruškové šťávy (jablečná může mít vyšší tržní hodnotu kvůli podobnostem v jejich organoleptických vlastnostech, jako je barva, chuť a pocit v ústech), spolu s jejich prakticky nerozlišitelnými sacharidovými profily (glukóza, fruktóza a sacharóza) a polyolovými (sorbitolovými) profily [13].

Schopnost detekovat nehlášené přidání šťávy s nižší ekonomickou hodnotou k šťávě s vyšší hodnotou je klíčem k odhalení falšování ovocných šťáv. Studie *Willems a kol.*

(2018) zjistila, že přidání hruškové šťávy do jablečné může být detekováno přítomností arbutinu. Ten je totiž obsažen ve všech produktech z hrušek [13].

Charakteristické sloučeniny pro hruškové šťávy by se mohly případně použít jako ukazatel pro zemi původu produktu. To by mohlo být možné díky faktu, že vzorky hruškové šťávy získané z Číny se liší od vzorků získaných z jiných zeměpisných oblastí. Analytické výsledky této studie ukázaly, že komerční vzorky z Číny vykazovaly vysoké koncentrace arbutinu (> 100 ppm) ve srovnání se vzorky získanými z jiných geografických oblastí. Tyto rozdíly jsou pravděpodobně způsobeny ovocnými odrůdami používanými pro výrobu šťávy. K výrobě komerčních hruškových šťáv produkovaných v Severní a Jižní Americe jsou používány hlavně hrušky odrůdy 'Williamsova', 'Anjou' a 'Boscova lahvice', spolu s menšími koncentracemi hruškových odrůd, které jsou členy druhu *Pyrus communis* L. nebo dalších evropských odrůd. Avšak v Asii se běžně pěstují asijské odrůdy a bylo prokázáno, že obsahují menší množství fenolických látek ve srovnání s jinými druhy *Pyrus*, což může vést k rozdílu mezi geografickými regiony pozorovanými v této studii. Schopnost rozlišovat hruškové koncentráty na základě regionů pěstování je prospěšná, protože šťávy produkované v různých zeměpisných oblastech se mohou lišit v ceně a spotřebitelé se stále více zajímají o to, odkud pochází produkty, které zakoupili, což by mohlo vést ke geografickému falšování [13].

#### **4.5.2 Použití při léčbě infekce močových cest**

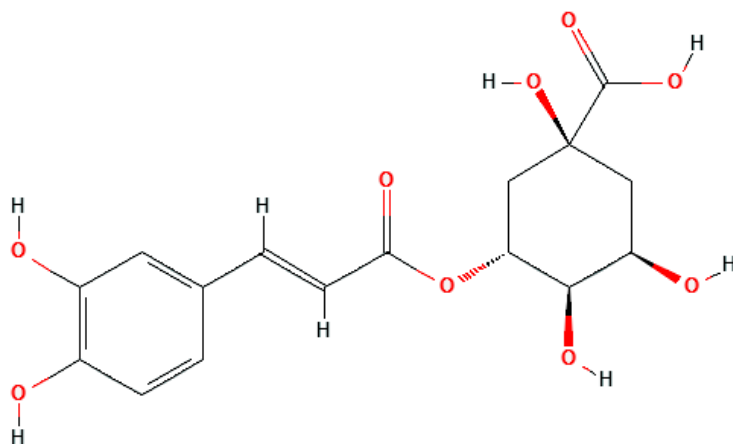
Vodné extrakty rostlinných materiálů obsahujících arbutin se používají k léčbě infekcí močových cest většinou jako složky komplexních bylinných léčiv. Hydrochinon jako aglykon arbutinu je zodpovědný za antibakteriální aktivitu rostlinných extraktů. Vykazuje svíravé a dezinfekční vlastnosti. Po perorálním podání dosáhne nemodifikovaný arbutin tenkého střeva. Ukázalo se, že je arbutin absorbován ve většině v nezměněné formě ze střeva a rozložen  $\beta$ -glukosidázou v játrech na hydrochinon a glukózu, následně je konjugován s kyselinou glukuronovou nebo sírovou. Konjugáty hydrochinonu se vylučují hlavně močí s malým množstvím volného hydrochinonu přítomného ve zdravé moči. Bylo pozorováno, že množství volného hydrochinonu v moči se zvyšuje během infekce močových cest v důsledku aktivity patogenních bakterií. Bakteriální aktivita způsobuje alkalizaci moči, což je výhodné při

podávání extraktů obsahujících arbutin, protože alkalické pH umožňuje hydrolýzu konjugátů hydrochinonu. Udržování alkalizované moči během léčby infekce močových cest je však v rozporu s obecně přijímaným principem léčby infekce močových cest založeným na okyselení moči. Široce používaná kyselina l-askorbová a další okyselovací činidla v moči zvyšují množství oxidu dusnatého (NO) a inhibují růst patogenních bakterií [14].

#### 4.6 Kyselina chlorogenová

Molekulový vzorec:  $C_{16}H_{18}O_9$

MW: 354,31 g/mol [15].



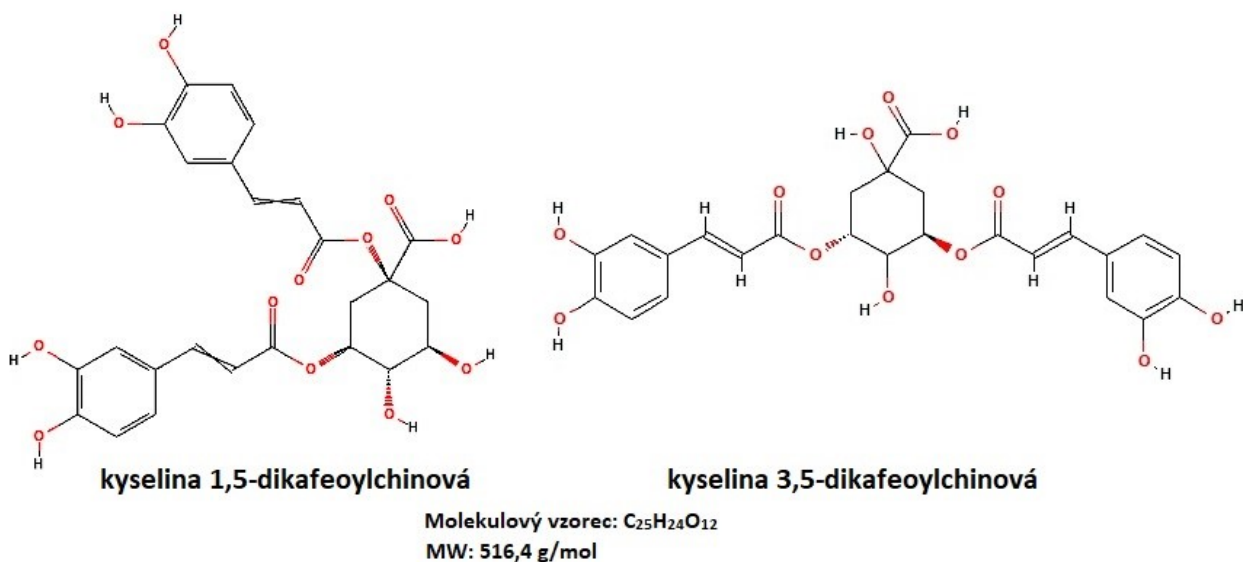
Obrázek 3 Strukturální vzorec kyseliny chlorogenové [15].

Kyselina chlorogenová (kyselina 3- kafeoylchinová, 3-CQA) je ester tvořený kyselinou kávovou a kyselinou L-činovou. Je to nejdůležitější antioxidačně aktivní složka v hruškách. Jako potenciální chemoprotektivní látka, může podporovat prevenci chronických onemocnění, jako je rakovina, kardiovaskulární onemocnění a snižuje relativní riziko vzniku Alzheimerovy choroby. Dále může podporovat protinádorovou aktivitu, posílení imunitního systému a snížení toxických účinků chemoterapie. Mezi její další zdravotní výhody patří zlepšení vazoreaktivity, antihypertenzní účinek a inhibiční účinek na hromadění tuku. Také má antibakteriální a protizánětlivé účinky [10,16].

Dále se také podílí na snižování rizika diabetu typu 2. Kyselina chlorogenová má hypoglykemický účinek, díky kterému snižuje koncentraci glukózy v krvi (působí na glukóza-6- fosfatázu (G6P), enzym zasahující do kontroly krevní glukózy). Dále má stimulační účinek na transport glukózy v kosterním svalu. Stimuluje transport glukózy v kosterním svalu mechanismem nezávislým na inzulínu [19].

Kyselina chlorogenová je hydrolyzována střevní mikroflórou na různé metabolity aromatických kyselin včetně kyseliny kávové a chinové. Kromě toho se uvádí, že míra absorpce kyseliny kávové v tenkém střevě člověka je 95 %, ale kyseliny chlorogenové jen 33 %. Tato pozorování naznačují, že účinky kyseliny chlorogenové na zdraví mohou být přičítány účinkům kyseliny kávové odvozené od kyseliny chlorogenové [19].

Mezi izomery kyseliny chlorogenové patří například kyselina 4- kafeoylchinová (4-CQA) a kyselina 5- kafeoylchinová (5-CQA). Molekuly s více než jednou skupinou kyseliny kávové se označují jako isochlorogenové kyseliny (dikafeoylchinové kyseliny). Existují v několika isomerech jako jsou například kyselina 3,4- dikafeoylchinová (3,4-DCQA), kyselina 3,5- dikafeoylchinová (3,5-DCQA) a kyselina 1,5- dikafeoylchinová (1,5-DCQA) [16].

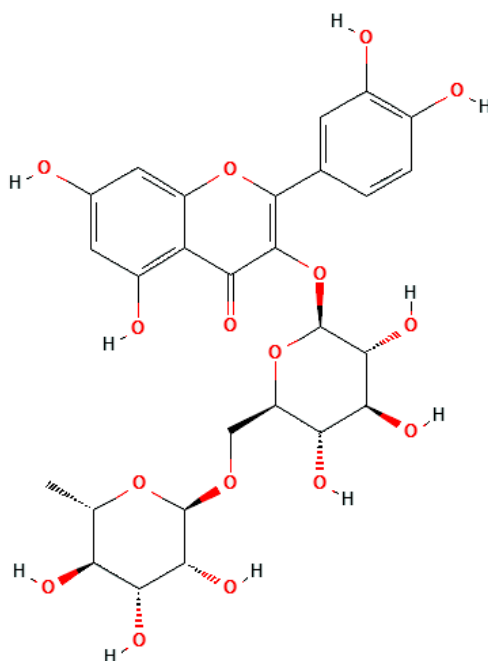


Obrázek 4 Příklady strukturních vzorců dikafeoylchinových kyselin [17,18].

## 4.7 Rutin

Molekulový vzorec: C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>16</sub>

MW: 610,5 g/mol [20].



Obrázek 5 Strukturální vzorec rutinu [20].

Rutin (kvercetin-3-rutinosid) je bioaktivní rostlinný flavonoid. Flavonoidy jsou exogenní antioxidanty a působí v různých fázích oxidačních procesů, včetně působení jako vychytávače radikálů, donory vodíku, donory elektronů, rozkladače peroxidů, singletové kyslíkové zhášeče, inhibitory enzymů a látky chelatuující kovy. Flavonoidy jsou účinné v prevenci kapilárního krvácení a křehkosti kapilár. Kromě toho má tato skupina sloučenin značně široké spektrum farmakologických vlastností, včetně antioxidačních, antialergických, protizánětlivých, antidiabetických, hepatoprotektivních, gastroprotektivních, antivirových a antineoplastických [21].

Rutin je syntetizován ve vyšších rostlinách a byl nalezen v různých druzích ovoce, zejména v citrusových plodech a bobulích. Rutin se také nazývá vitamin P, který je široce rozšířen v zelenině, ovoci a léčivých bylinách [22].

Použití rutinu je omezené, jelikož je málo rozpustný ve vodě (0,125 g/l). Používá se v potravinách v různých formách, jako jsou barviva, antioxidanty, konzervační látky,

stabilizátory a absorbenty UV. Používá se také jako aktivní složka v různých multivitaminových přípravcích, kosmetickém a chemickém průmyslu a v krmivech pro zvířata [21,22].

#### 4.8 Další látky v plodech

Hrušky mají z jádrového ovoce největší koeficient jedlého podílu, který činí 91 %. Obsah vitamínů C, E a B komplexu je vysoký. V hruškách je obsaženo ze všech druhů jádrového ovoce nejvíce vitamínů B2 a zejména B6. Vitamíny C a E jsou silné antioxidanty a patří mezi základní živiny. Hladina bílkovin a tuků je v hruškách nízká. Jsou velmi dobrým zdrojem vlákniny, mědi a draslíku. Hrušky jsou neobyčejným zdrojem vlákniny, je-li slupka konzumována spolu s dužinou [2,10].

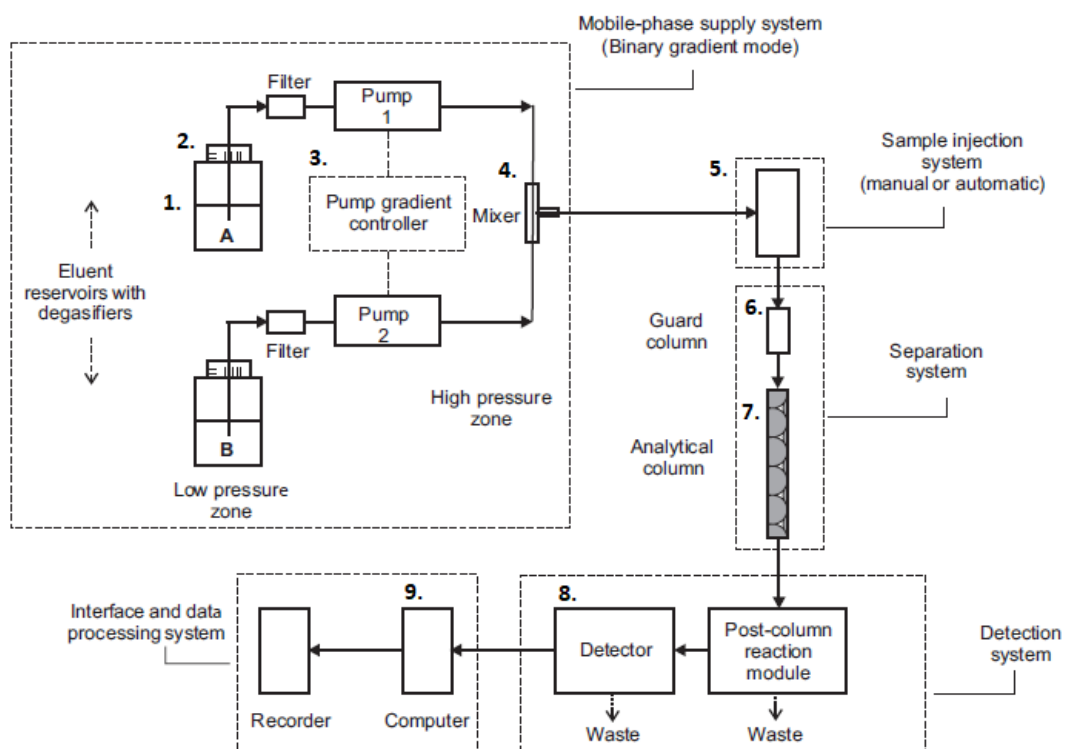
Tabulka 1 Seznam obsahových látek v plodech evropských hrušní [2].

Základní složky			
Voda	83,71 g	Popeloviny	0,33 g
Energie	58 kcal (242 kJ)	Uhlovodíky	15,46 g
Bílkoviny	0,38 g	Vláknina	3,1 g
Lipidy	0,12 g	Sacharidy	9,8 g
Minerální prvky			
Vápník	9 mg	Sodík	1 mg
Železo	0,17 mg	Zinek	0,1 mg
Hořčík	7 mg	Měď	0,08 mg
Fosfor	11 mg	Mangan	0,05 mg
Draslík	121 mg	Selen	0,10 µg
Vitamíny			
Vitamin C	4,2 mg	Cholin	5,10 mg
Vitamin B1 (Tiamin)	0,01 mg	Kyselina listová	0,7 µg
Vitamin B2 (Riboflavin)	0,03 mg	Vitamin K	4,5 µg

Vitamin B3 (Niacin)	0,16 mg	$\beta$ -karoten	13 $\mu$ g
Kyselina pantotenová (B5)	0,05 mg	Cryptoxanthin	2 $\mu$ g
Vitamin B6 (Pyridoxin)	0,03 mg	Lutein + zeaxanthin	45 $\mu$ g
Vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol)	0,12 mg		
Lipidy			
Nasyčené MK	0,006 g	Nenasycené MK	0,026 g
Aminokyseliny			
Aminokyseliny celkem	0,3 g		

\*V tabulce jsou uvedeny hodnoty ve 100 g čerstvého plodu

#### 4.9 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)



Obrázek 6 Schéma HPLC systému [23].

Kapalinová chromatografie je založená na použití kapalně mobilní fáze a může využívat všech základních principů separace látek ze směsí – adsorpční, rozdělovací, iontovýměnné i gelové chromatografie. Podle uspořádání chromatografického systému



se jedná o kolonovou chromatografii využívající eluční způsob vyvíjení. Uspořádání fází v HPLC může být normální, ale častěji se jedná o obrácené (reverzní) uspořádání. HPLC separace je nejpoužívanější analytickou technikou díky své jednoduchosti a všestrannosti [23].

System HPLC se v zásadě skládá z pěti hlavních částí: zásobní systém pro mobilní fázi, systém vstřikování vzorku, separační systém, detekční systém a rozhraní a systém zpracování dat. Zásobníky MF (1) musí být dobře uzavřeny, aby se zabránilo odpařování rozpouštědel a jsou opatřeny filtry kvůli odstranění drobných mechanických nečistot. MF se dále v degasseru (2) zbavuje rozpuštěných plynů. Plyny v rozpouštědle mohou narušit podmínky separace a vést ke špatným signálům v detektoru. Průtok MF systémem zajišťuje vysokotlaké čerpadlo (3). Většinou umožňuje čerpání vodné a organické složky mobilní fáze odděleně a jejich poměr je pak nastaven v ovládacím programu, podle kterého je čerpán daný podíl vodné nebo organické složky do směšovače (4). Toto uspořádání také umožňuje snadno měnit složení mobilní fáze v průběhu experimentální práce nebo využít tzv. gradientové eluce. Vzorek je dávkován do systému nástřikovou jehlou (5) a to buď automaticky autosamplerem nebo manuálně např. Hamiltonovou stříkačkou. V separačním systému se nachází předkolona (6), která chrání analytickou kolonu (7) před možnými zbytky matrice vzorku, které by mohly snížit životnost analytické kolony zejména při analýze biologického materiálu. Předkolona je plněna většinou stejným sorbentem jako analytická kolona, je ale významně kratší. Analytická kolona je nerezová trubice naplněná stacionární fází pro separaci analytů a nachází se v termostatovaném prostoru [23].

V HPLC lze použít různý typ stacionární fáze a použít k separaci jakékoli chromatografické metody, jako je adsorpční, rozdělovací, iontovýměnná i gelová chromatografie. Za kolonou je zapojen detekční systém (8), který je vybavený průtokovou detekční celou a musí být schopný dostatečně rychle reagovat na průchod separovaných složek. V HPLC se používá několik typů detektorů, z nichž každý má své výhody a nevýhody, jako například UV-VIS detektor, fluorescenční detektor a hmotnostní spektroskopický detektor. Data shromážděná detektorem jsou přenášena do počítačového softwaru (9) k nakreslení chromatogramu. Tento chromatogram lze

analyzovat ručně nebo pomocí specializovaného softwaru. Takové základní uspořádání je schematicky znázorněno na obr. 6 [23].

#### 4.9.1 Kolona Ascentis Express RP-Amide

Kolona využitá v této diplomové práci Ascentis Express RP-amide představuje stabilní kolonu s reverzními fázemi, kterou lze použít pro bazické, kyselé nebo neutrální sloučeniny. Jednostupňově vázaná, endcappovaná, amidová, polárně vázaná stacionární fáze poskytuje stabilní, reverzní fázové plnění se sníženým hydrofobním charakterem. Ascentis Express RP-Amid má podobnou retenci, jako má C18 nebo C8, ale odlišnou selektivitu pro některé sloučeniny ve srovnání s alkylovými fázemi (báze mají obvykle kratší retenci ve srovnání s kolonami C18) [24,25].

Ascentis Express RP-Amide se nejlépe používá u mobilních fází, které jsou směsí methanolu a vody nebo acetonitrilu a vody. Vyšší hladiny organického rozpouštědla obvykle snižují retenci sloučenin vzorku. Použití zvýšených teplot (např. 40 – 60 °C) snižuje viskozitu mobilní fáze a umožní použití rychlejších průtoků a nižšího tlaku na koloně. Techniky gradientové eluce využívající 5-10% organické složky jako počáteční mobilní fáze se zvyšováním na 100% organické složky jako konečnou mobilní fázi mohou často zlepšit separaci komplexních směsí vzorků v minimálním čase [24,25].

Tato kolona byla použita i ve studii *González-González a kol. (2019)* pro stanovení šesti fenolických kyselin (kyselina galová, kyselina vanilová, kyselina p-hydroxybenzoová, kyselina kávová, kyselina p-kumarová a kyselina trans-skořicová) ve vodných extraktech *Brosimum alicastrum* (listy, kůra a semena), *Solanum elaeagnifolium* (listy) a *Ampelocissus acapulcensis* (kořen). Mimo jiné byla v této studii srovnána s kolonou XBridge-C18. Při použití kolony Ascentis-Express RP-Amide byly všechny fenolové kyseliny odděleny na základní linií, kdežto při použití kolony XBridge-C18 došlo k překrývání fenolických kyselin [26].

Ve studii *Mattonai a kol. (2016)* byla tato kolona použita pro separaci 24 fenolických látek (kyselina galová, kyselina 3,4-dihydroxybenzoová, kyselina 4-hydroxybenzoová, kyselina 3-hydroxybenzoová, kyselina vanilová, kyselina benzoová, kyselina syringová, kyselina kávová, kyselina chlorogenová, kyselina salicylová, kyselina p-kumarová,

kyselina ferulová, kyselina sinapová, kyselina o-kumarová, hesperidin, kyselina abscisová, kyselina trans-skořicová, rutin, kyselina ellagová, kvercitrin, myricetin, naringenin, kvercetin a genistein) ve 36 vzorcích medu z Toskánska (Itálie) [27].

#### **4.10 Stanovení antioxidantů**

Fenolické látky a flavonoidy patří do skupiny přírodních antioxidantů, které mají významný vliv na lidské zdraví, jako je například schopnost eliminovat negativní účinky volných radikálů v krvi, inhibice oxidace lipidů (reagují s hydroperoxidovým volným radikálem na málo reaktivní hydroperoxid, tím přeruší řetězovou radikálovou reakci). Antioxidanty také ovlivňují i procesy regulace krevního tlaku a hladiny glukosy v krvi. Mají i protinádorové, antimikrobiální a protizánětlivé vlastnosti [28].

##### **4.10.1 Průtoková injekční analýza**

Průtoková injekční analýza (FIA) je založena na vstřikování kapalného vzorku do pohybujícího se kontinuálního nosného proudu vhodné kapaliny. Vstřikovaný vzorek tvoří zónu, která je poté transportována směrem k detektoru, který nepřetržitě zaznamenává absorbanci, potenciál elektrody nebo jiný fyzikální parametr, který se neustále mění v důsledku průchodu vzorku skrz průtokovou komoru [29].

Průtoková injekční analýza s elektrochemickou detekcí (FIA-ED) má dominantní roli při hodnocení antioxidantní aktivity (patří k nejdůležitějším antioxidantním parametrům), která je definována jako schopnost sloučeniny (nebo směsi sloučenin) inhibovat oxidační degradaci různých sloučenin, jako je prevence peroxidace lipidů (tyto metody jsou obvykle založeny na přímé reakci mezi studovanými sloučeninami a volnými radikály nebo na reakci s přechodnými kovy). FIA-ED umožňuje pracovat na selektivním cílovém potenciálu, což poskytuje snadný a přímý způsob jak pro vyhodnocení antioxidantní aktivity, tak pro kvantifikaci antioxidantů. Má podobnou charakteristiku jako vysoce účinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí (HPLC-ED), ale technika HPLC umožňuje separovat jednotlivé analyty ve srovnání s FIA-ED. Z výše uvedených parametrů je FIA-ED rychlejší a vyžaduje pouze jednoduché vybavení [30].

Existuje řada studií, které využívají vícekanálový coulometrický detektor pro stanovení hladin antioxidantů jako jsou polyfenoly v tělesných tekutinách. Coulometrický detektor totiž umožňuje vyšší citlivost a nižší šum ve srovnání s amperometrickými detektory [30].

Elektrochemické metody mají veliký potenciál pro výzkum antioxidantů, stanovení antioxidační kapacity a měření elektrochemického indexu (elektrochemický index (EI) je vyjádřen jako celkový fenolický obsah získaný z elektrochemie). Elektrochemie je atraktivní alternativou ke spektrofotometrickým metodám pro stanovení celkového množství fenolů. Pro účely stanovení mohou být použity různé typy elektrod. Zařízení mohou být stacionární nebo průtokové a mohou být založena na cyklické nebo diferenciální pulzní voltametrii a potenciostatické analýze. Metody jsou známé pro svou vhodnost pro kontrolu potravin a sledování hladin antioxidační aktivity v jiných biologických vzorcích a maticích [30, 31].

#### **4.10.2 CoulArray detektor**

Jde o elektrochemický detektor, který umožňuje sledování elektroaktivních látek a je určen především ke stanovení celkové antioxidační aktivity (total antioxidant activity, TAA). TAA kvantifikuje kapacitu vzorku biologického materiálu eliminovat radikály a slouží k charakterizaci antioxidační aktivity směsných vzorků jako celku (většinu přírodních antioxidantů přijímáme jako součást složitých směsí) [32].

Při detekci dochází k přeměně elektroaktivní látky na elektrodách (z pórovitého grafitu). Na celý detektoru jsou vloženy rozdílné potenciály. Každá cela poskytuje samostatný signál. Cela obsahuje 3 elektrody (pracovní elektroda z pórovitého grafitu, referenční hydrogenpaladiová elektroda, pomocná uhlíková elektroda). Na elektrody je aplikovaný potenciál, který je hnací silou pro oxidaci/redukci analytu, což vede k průtoku proudu, jehož velikost je úměrná koncentraci analytu. Na pracovní elektrodě probíhá oxidace/redukce, na pomocné elektrodě probíhá komplementární elektrolytická reakce a referenční elektroda zajišťuje stabilitu potenciálu aplikovaného oproti pracovní elektrodě [28].

Odezva detektoru je závislá na redoxních vlastnostech analyzovaných látek a může být použita pro relativní srovnávání antioxidačních schopností extrahovaných látek. Mezi výhody CoulArray detektoru patří jeho citlivost, selektivita a možnost pracovat s gradientovou elucí. Často ani není třeba izolovat látky z kapalných matric (nápojů). Maximální citlivosti stanovení je dosaženo současným snímáním signálů ze všech elektrod a následným výběrem vhodného potenciálu, při kterém má daná látka nejvyšší proudovou odezvu [28].

#### 4.11 Příklady předchozích studií stanovení fenolických látek v hrušních

Tabulka 2 Souhrn předchozích studií a chromatografických metod stanovení

Vzorek	Stanovované látky	Mobilní fáze	Typ kolony	Detekce	Zdroj
Plody	kyselina chlorogenová, rutin, kvercetin-3-O-galaktosid, isokvercitrin, isorhamnetin rutinosid, kvercitrin, kvercitrin malonyl glukosid a isorhamnetin glukosid	H <sub>2</sub> O + 0,05% CF <sub>3</sub> COOH, ACN	ACE (3 μm, C18, 150 × 4.6 mm) předkolona ACE (3 μm, C18)	PDA	[4]
Slupka a dužina	arbutin, derivát tryptofanu, kyselina 3- kafeoylchinová, dimery prokyanidinu, katechin, kyselina 5- kafeoylchinová, coumaroyl hexosid kyseliny jablečné, kyselina 4- kafeoylchinová, epikatechin, kyselina coumaroylchinová, kyanidin-3-O-hexosid, hexosid kyseliny syringové, peonidin-3-O-hexosid, kyselina kumarová, kvercetin-3-O-rutinosid, kvercetin-3-O-galaktosid, kvercetin-3-O-glukosid, di-O-kafeoylchinová kyselina, isorhamnetin-3-O-rutinosidy, isorhamnetin-3-O-hexosidy a isorhamnetin acetyl hexosidy	H <sub>2</sub> O + 1% HCOOH, ACN	Lichrospher RP-18, 5 μm s předkolonou ze stejného materiálu	DAD a ESI/MS-MS	[5]
Listy	arbutin, deriváty arbutinu, hydroxyskořicová kyselina, chlorogenová kyselina, p-kumarová kyselina, deriváty kyseliny p-kumarové a flavonolové glykosidy	H <sub>2</sub> O + 5% HCOOH, MeOH	Shandon Hypersil ODS (3 μm, RP, 250 × 4 mm)	DAD	[6]
Listy	kyselina kávová, kyselina chlorogenová, kyselina sinapová, kyselina syringová, kyselina vanilová, rutin, katechin a epikatechin	H <sub>2</sub> O + 2% CH <sub>3</sub> COOH a H <sub>2</sub> O + ACN (1:1) + 0,5% CH <sub>3</sub> COOH	Chromsep SS (250 × 4.6 mm, Hypersil 5 ODS) předkolona Chromsep (10 × 3 mm)	DAD	[7]
Listy, kůra a plody	arbutin	7% MeOH	ACE 5 C-18 (5 μm, 250 mm × 4.6 mm)	UV-VIS	[8]

Slupka	arbutin, 4-(O-β-D-glucopyranosyl)-3-(3'-methyl-2'-butenyl)-benozoová kyselina, 3,4- dihydroxybenzoová kyselina, trans-chlorogenová kyselina, cis- chlorogenová kyselina, isorhamnetin 3-O-β-D-glucopyranosid, 3,5- dikafeoylchinová kyselina a (-)-epikatechin	80% MeOH	Sephadex LH-20 (820 × 33 mm)	ESI-MS	[33]
Dužina, slupka, semena a listy	kyselina chinová, kafeoyl N-tryptofan, kyselina protokatechová, kyselina 3,5-di-O-kafeoylchinová, p-coumaroylhexosa, kyselina 1-kafeoylchinová, kafeoylhexosa, kyselina p-kumarová, kyselina 3-kafeoylchinová, kyselina p-coumaroylkafeoylchinová, kyselina cis-3-kafeoylchinová, kyselina cis-4-p-coumaroylchinová, kyselina trans-5-p-coumaroylchinová, kyselina 5-kafeoylchinová, kyselina ferulová, kyselina cis-4-kafeoylchinová, kafeoylhexosa, kyselina cis-1-kafeoylchinová, p-coumaroylhexosa (isomer 2), kyselina feruloyldikafeoylchinová, kafeoylhexosa, kyselina 4-kafeoylchinová, kyselina kafeoyl-L-jablečná, kyselina cis-5-p-coumaroylchinová, dimer kyseliny p-coumaroylchinové, kyselina 3,4-di-O-kafeoylchinová, kyselina 3-p-coumaroylchinová, kyselina cis-5-kafeoylchinová, kyselina kafeoyl-p-coumaroylchinová, neznámý derivát kafeoylhexosy, feruloylchinová kyselina, dimer A-typu procyanidinu, (+)-katechin, dimery B-typu procyanidinu, tetramery B-typu procyanidinu, trimery B-typu procyanidinu, epikatechin-O-3,4-dimethylgallát, (-)-epikatechin, pentamer B-typu procyanidinu, kaempferol 3-O-galaktosid, kvercetin 3-O-rutinosid, kvercetin 3-O-galaktosid, kvercetin 3-O-glukosid, kaempferol 3-O-rutinosid, isorhamnetin 3-O-rutinosid, isorhamnetin 3-O-galaktosid, kaempferol 3-O-glukosid, isorhamnetin 3-O-glukosid, kaempferol-3-O-6-acetylglukosid, apigenin pentosid, arbutin, kyanidin 3-O-glukosid	H2O + 0,1% HCOOH, ACN	BEH C18 (1,7 μm, 100 × 2,1 mm)	PDA a Q / TOF-MS	[34]

<p>Slupka (16 odrůd)</p>	<p>arbutin, kyanidin 3-O-galaktosid, kyselina 3-kafeoylchinová, peonidin 3-O-galaktosid, kyselina chlorogenová, katechin, kyselina 4-kafeoychinová, kyselina kávová, kyselina Z-kafeoylchinová, epikatechin, kyselina p-coumaroylchinová, kyselina kafeoylšikimová, kvercetin 3-O-glukosylgalaktosid, kvercetin 3-O-2"-xylosyl-6"-rhamnosylglukosid, kyselina kafeoyljablečná, kvercetin 3-O-galaktosylglukosid, kvercetin 3-O-arabinosylglukosid, kvercetin O-pentosid, kaempferol O-dihexosid, kvercetin 3-O-rhamnosylgalaktosid, kvercetin 3-O-rutinosid, luteolin 7-O-rutinosid, kvercetin 3-O-galaktosid, kvercetin 3-O-glukosid, luteolin 7-O-glukosid, kyselina p-coumaroyljablečná, kaempferol-3-O-rhamnosylgalaktosid, luteolin 7-O-acetylmalonylglukosid, kyselina feruloyljablečná, kaempferol 3-O-rutinosid, isorhamnetin 3-O-robiniosid, isorhamnetin 3-O-rutinosid, kvercetin 3-O-6"-malonylglukosid, kyselina 3,4-dikafeoylchinová, isorhamnetin 3-O-galaktosid, chrysoeriol 7-O-rutinosid, kyselina 3,5-dikafeoylchinová, kaempferol 3-O-glukosid, isorhamnetin 3-O-glukosid, apigenin 7-O-glukosid, luteolin 4'-O-glukosid, kyselina dikafeoylchinová, trihydroxymethoxyflavon sulfát, chrysoeriol 7-O-glukosid, kyselina 4,5-dikafeoylchinová, methyl ester kyseliny kávové, isorhamnetin 3-O-6"-malonylgalaktosid, kaempferol 3-O-6"-malonylglukosid, isorhamnetin 3-O-6"-malonylglukosid, kvercetin glykosid, isorhamnetin 3-O-malonylgalaktosid, kyselina 1,3,5-trikafeoylchinová, apigenin 7-O-malonylglykosid, kyselina feruloyldikafeoylchinová, kyselina 3,4,5-trikafeoylchinová</p>	<p>H<sub>2</sub>O + 0,1% HCOOH, ACN + 0,1% HCOOH</p>	<p>Symmetry C18 (5 μm, 250 × 4,6 mm i.d.) předkolona Symmetry Sentry (5 μm, 20 × 3,9 mm)</p>	<p>DAD a ESI/MS</p>	<p>[35]</p>
--------------------------	---	--	--	---------------------	-------------



Větve, listy, stonky, slupka a dužina	arbutin	MeOH: H <sub>2</sub> O: 0,1 M HCl (5:94:1)	Wakosil-II 5C18 RS (5 μm, 250 × 4.6 mm) předkolona (5 μm, 8 × 4.6 mm)	UV	[36]
---	---------	---	--	----	------

Z tabulky je patrné, že pro separaci fenolických látek se nejčastěji používají kolony se sorbentem C18 spolu s mobilní fází, jejíž organická složka je složená z acetonitrilu nebo methanolu a vodná složka je okyselena kyselinou octovou nebo mravenčí. K detekci se nejčastěji používá PDA (DAD) detektor.

## 5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 5.1 Přístroje a podmínky separace

Tabulka 3 Chromatografický systém

Chromatografická souprava	Shimadzu LC-10		
Čerpadlo	LC-10AD VP		
Autosampler	SIL-HT A		
Dávkování	1 $\mu$ l (plody 5 $\mu$ l)		
Termostat kolony	CTO-10A VP		
Kolona	ASCENTIS Express RP-Amide 150 $\times$ 4.6 mm, 2.7 $\mu$ m		
Mobilní fáze	Acetonitril, ultračistá voda (kyselina fosforečná, pH= 2,2)		
Gradient	Čas [min]	ACN (%)	H <sub>2</sub> O pH 2,2 (%)
	0,01	10	90
	8	55	45
	8,20	90	10
	10,20	90	10
	10,51	stop	stop
Teplota	30 °C		
Detektor	DAD detektor SPM-M10A VP		
Detekce	220, 327, 354 nm		
Vyhodnocení	Software LC solution		

### 5.2 Chemikálie

Acetonitril (HPLC Gradient Grade), Sigma-Aldrich

Metanol (HPLC Gradient Grade), Sigma-Aldrich

Kyselina fosforečná 85%, Sigma-Aldrich

Kyselina mravenčí, Sigma Aldrich

Kyselina octová ledová, Sigma Aldrich

Ultračistá voda

Standardy:

Arbutin  $\geq$  98%, Sigma-Aldrich

Kyselina chlorogenová  $\geq$  95%, Sigma-Aldrich

Kyselina 1,5- dikafeoylchinová  $\geq$  98%, Sigma-Aldrich

Kyselina 3,5- dikafeoylchinová  $\geq$  98%, Sigma-Aldrich

Rutin  $>$  94%, Sigma-Aldrich

### **5.3 Příprava směsného roztoku standardů**

Roztoky standardů arbutinu, kyseliny chlorogenové, kyseliny 1,5- dikafeoylchinové, kyseliny 3,5- dikafeoylchinové a rutinu byly připraveny navážením 0,5 mg daného standardu a rozpuštěny v 1 ml methanolu (jejich koncentrace byla 0,5 mg/ml). Od každého standardu bylo odpipetováno 100  $\mu$ l za vzniku směsného roztoku standardů (koncentrace jednotlivých standardů ve směsi byla 100 mg/l).

### **5.4 Postup extrakce fenolických sloučenin ze vzorků**

#### **5.4.1 Listy, kůra, pupeny, květy a štěpka**

Vzorky bylo nejprve nutné důkladně usušit. Listí bylo důkladně zhomogenizované pomocí mixeru a byly odstraněny přebytečné části (řapík), které snižují výtěžnost. Ostatní vzorky byly homogenizovány ve třecí misce. Kůra byla získána sloupnutím vrchní části větvíček. Byl vytvořen směsný vzorek štěpky, vzniklý smícháním odrůd 'Konference', 'Clapova', 'Lucasova', 'Charneuská'. Po důkladné homogenizaci bylo na analytických váhách naváženo 0,05 g vzorku do 2 ml centrifugační eppendorf zkušavky. Následně byla provedena extrakce metanolem s přidavkem 0,1% mravenčí kyseliny. Následovala ultrazvuková lázeň po dobu 30 minut (s protřepáním po 10-ti minutách), centrifugace (15 minut, 5000 rpm), a filtrace přes 0,22  $\mu$ m PTFE stříkačkový filtr do vialky. Do analýzy byl extrakt skladován při 4 °C.

## 5.4.2 Plody

Vzorky byly homogenizovány v mixéru z 2-3 plodů se slupkou bez semen. Následně byly naváženy 3 g do 50 ml odstředivé plastové eppendorf centrifugační zkumavky. Vzorek byl extrahován 15 ml methanolem s 2% kyselinou octovou a umístěn do ultrazvukové lázně na 30 minut (s protřepáním po 10-ti minutách). Následně byl vzorek centrifugován (10 minut, 6000 rpm) a filtrován přes 0,45 µm PTFE filtr a skladován při 4 °C do analýzy.

## 5.5 Validační parametry

Validační parametry byly stanoveny před vypracováním práce.

**Tabulka 4 Linearita, výtěžnost, přesnost**

	Arbutin	Chlorogenová kyselina	Kyselina 3,5-dikafeoylchinová	Kyselina 1,5-dikafeoylchinová	Rutin
Linearita R <sup>2</sup>	0,999	0,998	0,999	0,999	0,997
[%] Výtěžnost	102,68	88,67	131,61	96,20	114,26
RSD [%] Přesnost	0,83	2,69	1,42	-	3,10

\* Linearita byla provedena na směsném roztoku standardů, výtěžnost a přesnost byla provedena na reálných extraktech listů.

**Tabulka 5 Opakovatelnost – Kyselina 3,5- dikafeoylchinová, kyselina 1,5- dikafeoylchinová, rutin**

	RSD Kyselina 3,5-dikafeoylchinová [%]	RSD Kyselina 1,5-dikafeoylchinová [%]	RSD Rutin [%]
20 mg/l	2,03	1,46	1,15
100 mg/l	2,63	3,09	1,28
250 mg/l	2,28	2,78	0,81

\*Opakovatelnost byla provedena na směsném roztoku standardů.

**Tabulka 6 Opakovatelnost – Arbutin a kyselina chlorogenová**

	RSD Arbutin [%]	RSD Chlorogenová [%]
100 mg/l	1,22	0,49
500 mg/l	0,63	0,56
1000 mg/l	0,81	0,62

\*Opakovatelnost byla provedena na směsném roztoku standardů.

## 5.6 Parametry chromatografické separace

Mezi hodnocené parametry chromatografické kolony patří retenční čas ( $t_R$ ), faktor symetrie ( $A_S$ ), rozlišení chromatografických píků ( $R_S$ ), šířka píku v 50% výšky ( $w_{50}$ ) a píková kapacita ( $P_c$ ).

Píková kapacita se vypočítá z následujícího vzorce:

$$P_c = 1 + t_g/w_b$$

$t_g$  ...doba trvání gradientu

$w_b$  ...šířka píku při základně

Tabulka 7 Parametry chromatografické separace

	$t_R$	$A_S$	$R_S$	$w_{50}$	$P_c$
Arbutin	2,28	1,843	7663	0,071	56,32
Kyselina chlorogenová	5,635	1,577	27,004	0,051	59,39
1,5-DCQA	8,275	-	0,937	0,057	44,79
3,5-DCQA	8,171	-	7,82	0,053	44,79
Rutin	7,361	1,64	16,632	0,05	56,32

\*DCQA...dikafeoylchinová kyselina

## 5.7 Optimalizace extrakce plodů

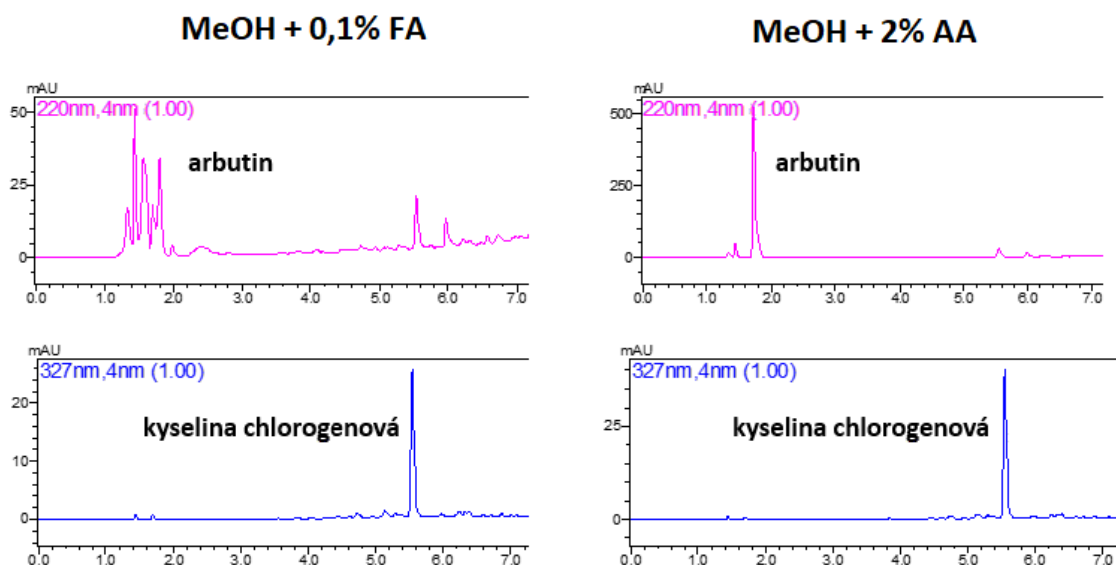
### 5.7.1 Optimalizace délky ultrazvukové lázně a výběr rozpouštědla

Optimalizace byla provedena na vzorku odrůdy 'Charneuská'. Byly naváženy 3 g do 50 ml odstředivé plastové eppendorf centrifugační zkumavky. Vzorky byly následně extrahovány 15 ml extrakčního činidla. Byla zvolena 2 extrakční činidla: metanol + 0,1% kyselina mravenčí (pH = 2,8) a methanol + 2% kyselina octová (pH = 2,83). Ultrazvuková lázeň trvala 10 min, 20 min a 30 min. Každý vzorek byl navážen dvakrát a byl měřen ve dvou nástřících.

**Tabulka 8 Porovnání účinku délky ultrazvukové lázně a typu extrakčního činidla**

Čas lázně	Arbutin		Kyselina chlorogenová	
	MeOH+ 0,1% FA	MeOH + 2% AA	MeOH+ 0,1% FA	MeOH + 2% AA
10 min	102175	1635269	75036	56514
20 min	115039	1652171	86285	97609
30 min	119817	1650802	97941	112873

\*V tabulce jsou uvedeny průměry ploch píků vztahované na průměry navážek 3 g.



**Obrázek 7 Příklady chromatogramů při ultrazvukové lázni 30 min.**

Na základě této optimalizace byl zvolen methanol + 2% kyselina octová a doba ultrazvukové lázně 30 min.

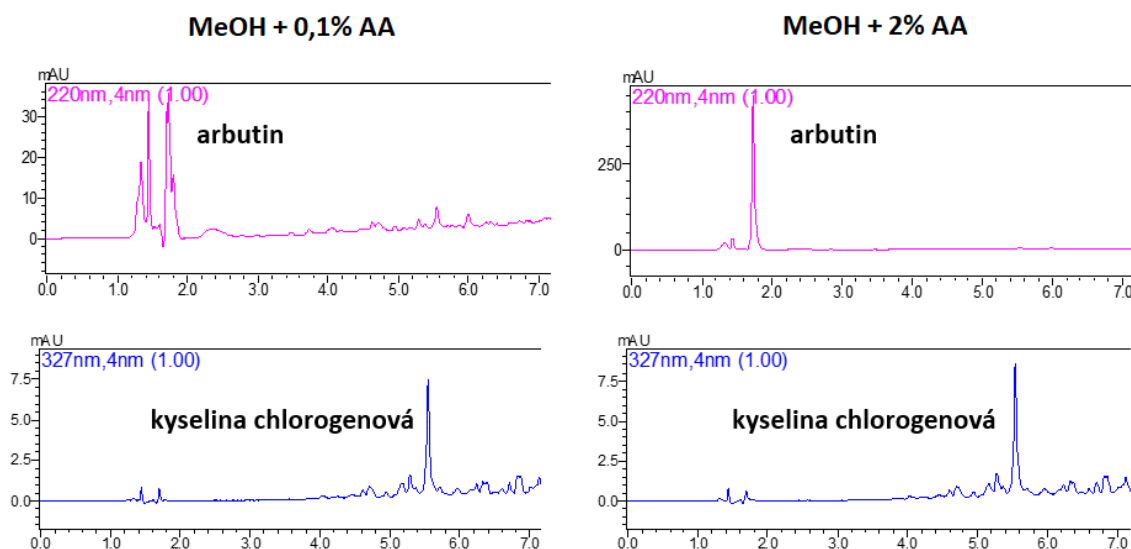
### 5.7.2 Optimalizace množství kyseliny octové

Optimalizace byla provedena na vzorku odrůdy 'Williamsova'. Byly naváženy 3 g vzorku do 50 ml odstředivé plastové eppendorf centrifugační zkušavky. Vzorky byly následně extrahovány 15 ml extrakčního činidla. Byla zvolena 2 extrakční činidla: methanol + 0,1% kyselina octová (pH = 4,22) a methanol + 2% kyselina octová (pH = 2,83). Ultrazvuková lázeň trvala 10 min, 20 min a 30 min. Každý vzorek byl navážen dvakrát a byl měřen ve dvou nástřicích.

**Tabulka 9 Porovnání koncentrací kyseliny octové**

Čas lázně	Arbutin		Kyselina chlorogenová	
	MeOH+ 0,1% AA	MeOH + 2% AA	MeOH+ 0,1% AA	MeOH + 2% AA
10 min	218875	1364934	29345	26829
20 min	214985	1361650	26332	33373
30 min	214494	1361963	27509	31822

\*V tabulce jsou uvedeny průměry ploch píků vztažené na průměry navážek 3 g.



**Obrázek 8 Příklady chromatogramů při ultrazvukové lázni 30 min.**

Na základě chromatogramů byl zvolen methanol + 2% kyselina octová jako účinnější extrakční činidlo.

## **5.8 Stanovení obsahu fenolických látek**

Celkem bylo k analýze využito 30 vzorků listí, 30 vzorků kůry, 30 vzorků pupenů, 10 vzorků plodů, 10 vzorků květů a 1 vzorek štěpky připraven smíchání 4 odrůd (viz kapitola 4.4.1.). Fenolické látky byly stanovovány v 10 odrůdách hrušní (‘Clapova’, ‘Konference’, ‘Williamsova červená’, ‘Williamsova’, ‘Charneuská’, ‘Lucasova’, ‘Higland’, ‘Grosdemange’, ‘Thiriotova’ a ‘General Leclerc’). V tabulce číslo 10 je přehled odrůd a popis vzhledu jejich plodů. Všechny vzorky byly poskytnuty z Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského v Holovousech. Vzorky byly odborně sesbírány v obdobích srpen – září 2019, říjen - listopad 2019 a březen - duben

2020. Vzorky plodů byly sbírány v období srpen – září 2019, květy a štěpka v období březen – duben. Veškerý materiál byl zpracován dle postupu v kapitole 4.4.1.

### 5.8.1 Výpočet koncentrace fenolických látek v extraktech

Každý vzorek byl nastříknut třikrát. Z nástřiků byl vypočítán průměr ploch, který byl následně přepočítán na jednotnou navážku 0,05 g dle vzorce:

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

A ...průměrná plocha píků

m ...hmotnost navážky

Koncentrace analytu byla vypočtena podle vzorce:

$$c_x = V_N * c_{ST} * A_x/A_{ST}$$

V<sub>N</sub> ...objem nástřiku (u listů, kůry, pupenů, květů a štěpky byl nástřik 1 μl, u plodů 5 μl)

A<sub>x</sub> ...průměrná plocha píku analytu

A<sub>ST</sub> ...průměrná plocha píku standardu

c<sub>x</sub> ...koncentrace analytu

c<sub>ST</sub> ...koncentrace standardu

Koncentrace standardu byla vypočtena podle vzorce:

$$c_{ST} = c_{ZÁS} * \text{zředění}$$

c<sub>ZÁS</sub> ...koncentrace zásobního roztoku

Nakonec byl proveden přepočet na množství použitého rozpouštědla (u listů, kůry, pupenů, květů a štěpky 2 ml, u plodů 15 ml). Výsledkem byla koncentrace v mg/ml. Tato koncentrace byla přepočítána na hodnotu reálné navážky vzorku a dále na mg/g s korekcí na čistotu daného standardu.

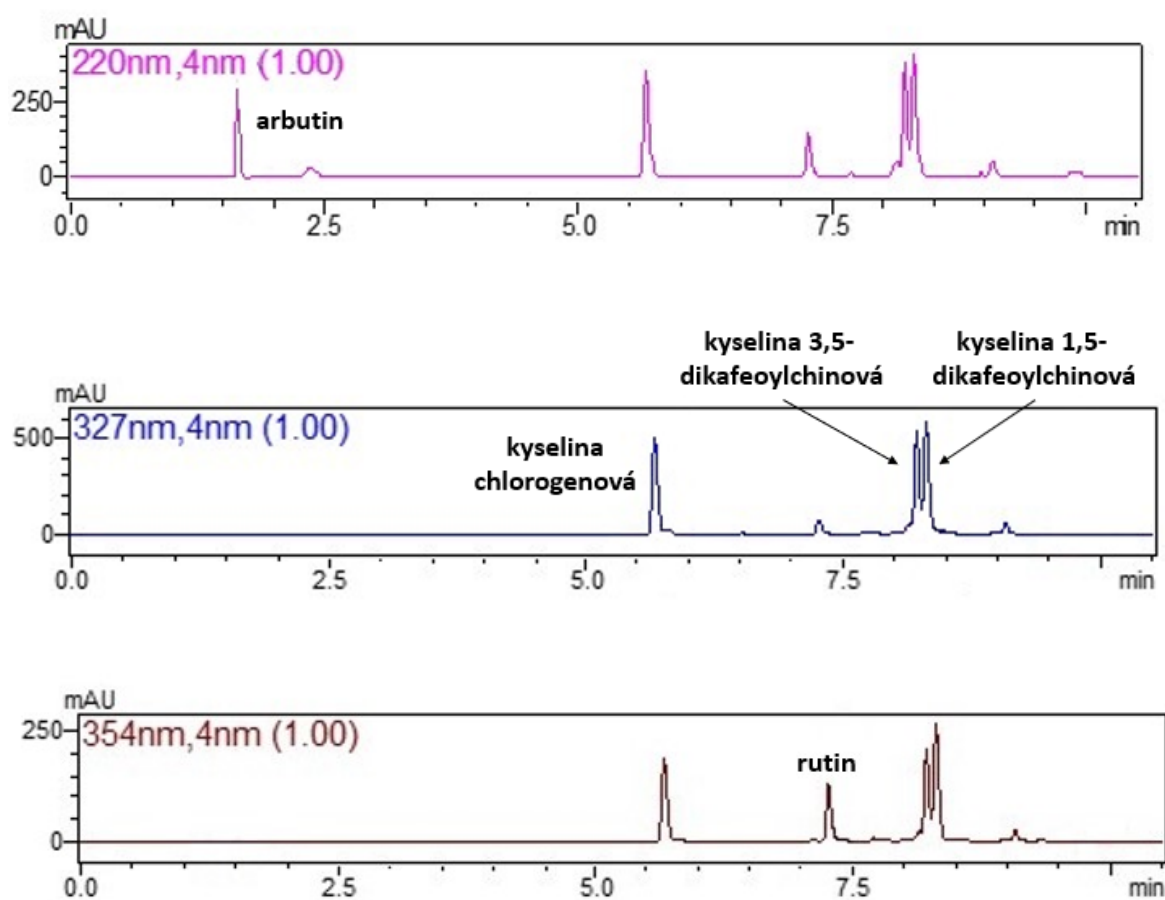
Získané výsledky pro jednotlivé vzorky jsou uvedeny v tabulkách kapitoly 5.1.



## 5.8.2 Detekce a identifikace fenolických látek v extraktech

Detekce byla provedena při vlnových délkách 220 nm, 327 nm a 354 nm v závislosti na absorpčním maximu jednotlivých fenolických sloučenin.

Identifikace jednotlivých fenolických látek byla provedena porovnáním retenčních časů látek z extraktů vzorků s retenčními časy jednotlivých standardů. Separační podmínky jsou sepsány v tabulce číslo 3. Na obr. 9 jsou chromatogramy jednotlivých standardů v závislosti na absorpčních maximech jednotlivých analytů. Arbutin byl sledován při 220 nm, kyselina chlorogenová a její deriváty při 327 nm a rutin při 354 nm.



Obrázek 9 Chromatogram směsného roztoku standardů

**Tabulka 10 Přehled testovaných odrůd a popis barvy plodu**

‘Clapova’	zelenožluté s červeným líčkem
‘Konference’	žlutozelené, šedavě rzivé
‘Williamsova červená’	žluté, na sluneční straně nápadně načervenalé
‘Williamsova’	žluté, na sluneční straně nenápadně načervenalé
‘Charneuská’	zelenavě žluté, na sluneční straně s narůžovělým líčkem
‘Lucasova’	zelenožluté až žluté se slabým růžovým líčkem
‘Higland’	zelenavě žluté
‘Grosdemange’	nažloutlé, s hnědočerveným líčkem a žiháním
‘Thiriotova’	žluté, na sluneční straně s červeným líčkem
‘General Leclerc’	nejprve žlutozelené, později nažloutlé, hustě hnědě tečkované

## 5.9 Stanovení celkové antioxidační aktivity

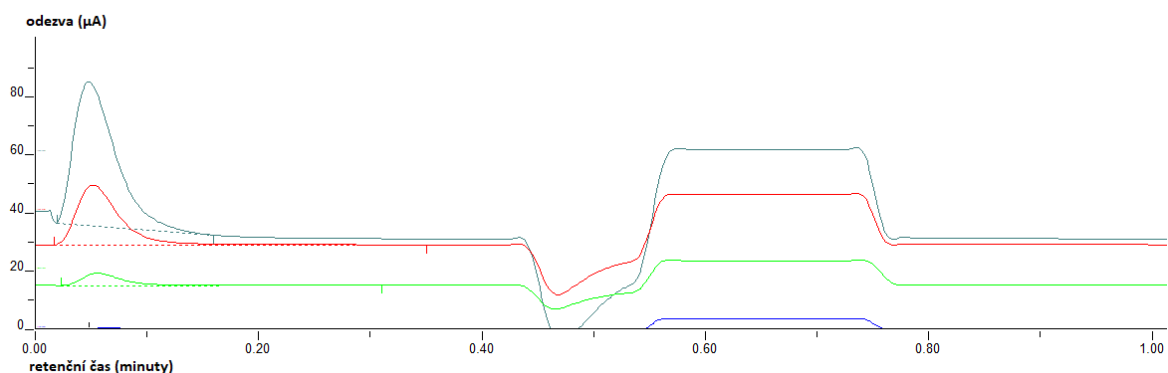
Pro hodnocení antioxidační aktivity elektroaktivních látek všech připravených extraktů byla použita průtoková injekční analýza (FIA) ve spojení s multikanálovým elektrochemickým detektorem CoulArray na pracovišti Radanal s.r.o. Každý extrakt byl měřen 3krát. Vzorky byly ředěny 20× (extrakty vzorků plodů ředěny nebyly).

### 5.9.1 Přístroj a podmínky stanovení

**Tabulka 11 Systém pro stanovení celkové antioxidační aktivity**

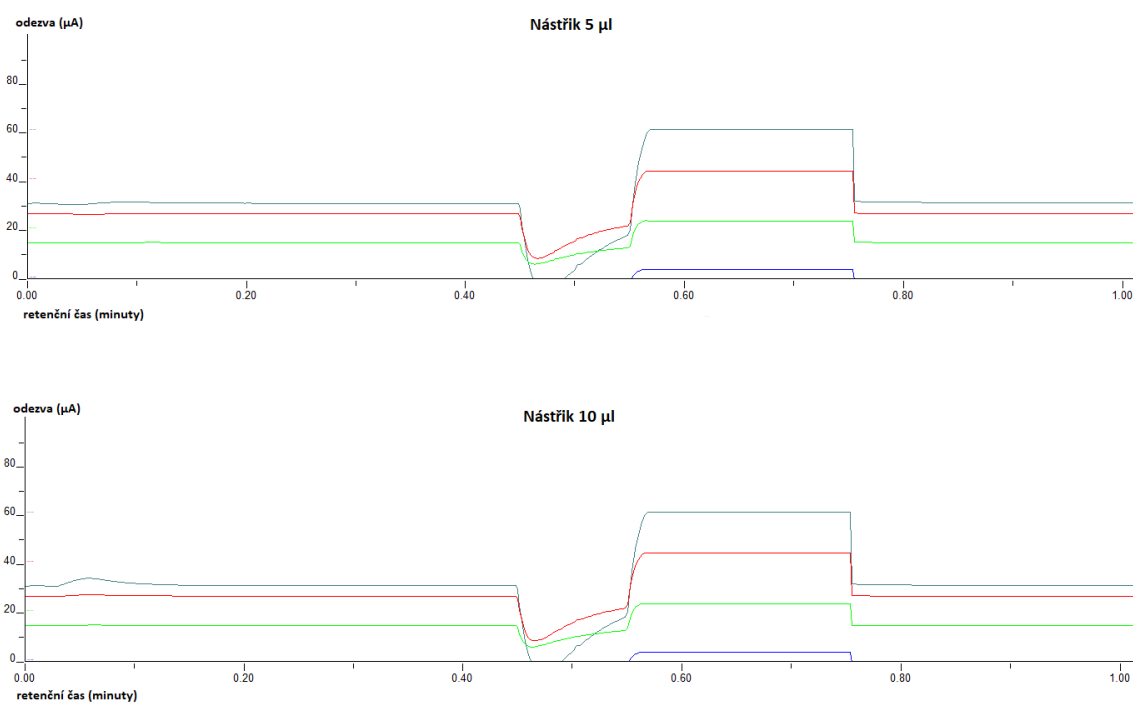
Detektor	CoulArray Detector ESA, Model 5600A
Autosampler	Autosampler ESA, model 542
Pumpa	Model 582 Solvent Delivery System
Software	CoulArray® for Windows®32
Mobilní fáze	90% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,05M; 10% ACN; pH=4,77
Průtok	1 ml/min
Potenciály na pracovních elektrodách	200, 400, 600, 800 mV
Teplota	30 °C
Nástřik	5 µl
Ředění	20krát, plody bez zředění
Referenční elektroda	Hydrogen-palladiová
Celkový čas analýzy	1,1 minut

## 5.9.2 Příklad grafického záznamu stanovení TAA



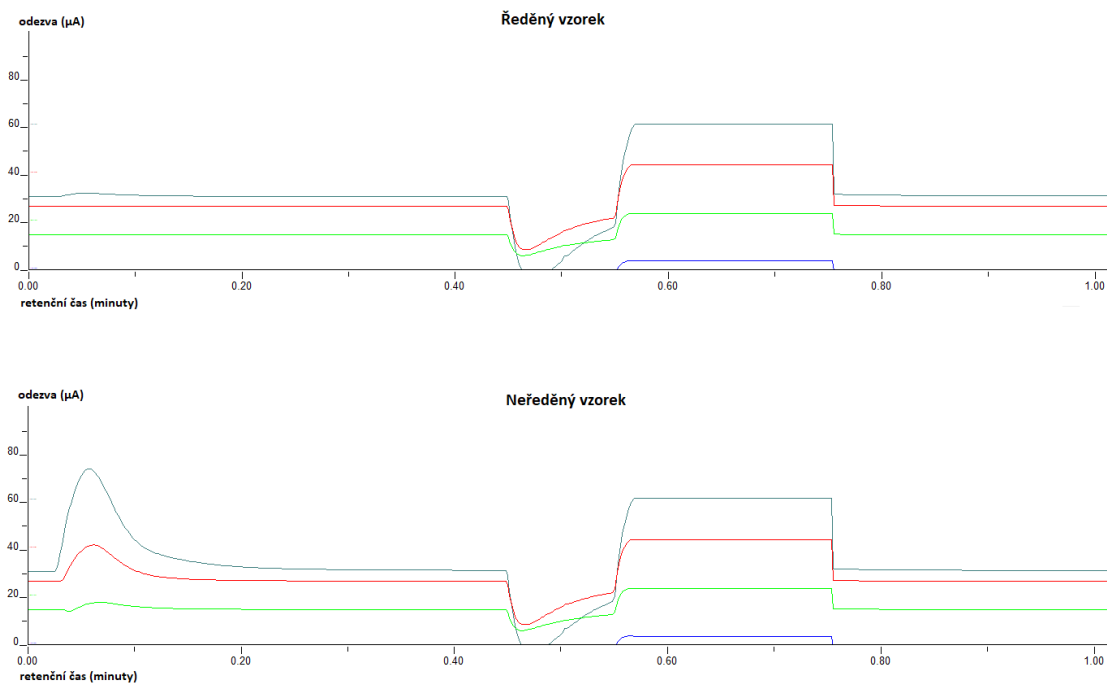
Obrázek 10 Příklad záznamu stanovení TAA u vzorku listí odrůdy 'Clapova'

## 5.9.3 Optimalizace nástřiku při analýze extraktů plodů



Obrázek 11 Porovnání nástřikovaných objemů (5 µl a 10 µl) u plodů odrůdy 'Clapova'

Při ředění extraktů plodů (stejně jako vzorků listí, kůry a pupenů, květů) byla velice nízká odezva detektoru, a to i při zvýšení nástřikovaného objemu z 5 µl na 10 µl (obr. 11).



**Obrázek 12 Porovnání ředěného a neředěného vzorku plodů odrůdy 'Clapova'**

Následně byl porovnán ředěný a neředěný vzorek při nástřiku 5 µl (obr. 12). Na základě odezvy, byly vzorky plodů měřeny neředěné při nástřiku 5 µl.

## 6. VÝSLEDKY

### 6.1 Obsah fenolických látek v jednotlivých odrůdách

#### 6.1.1 'Clapova'

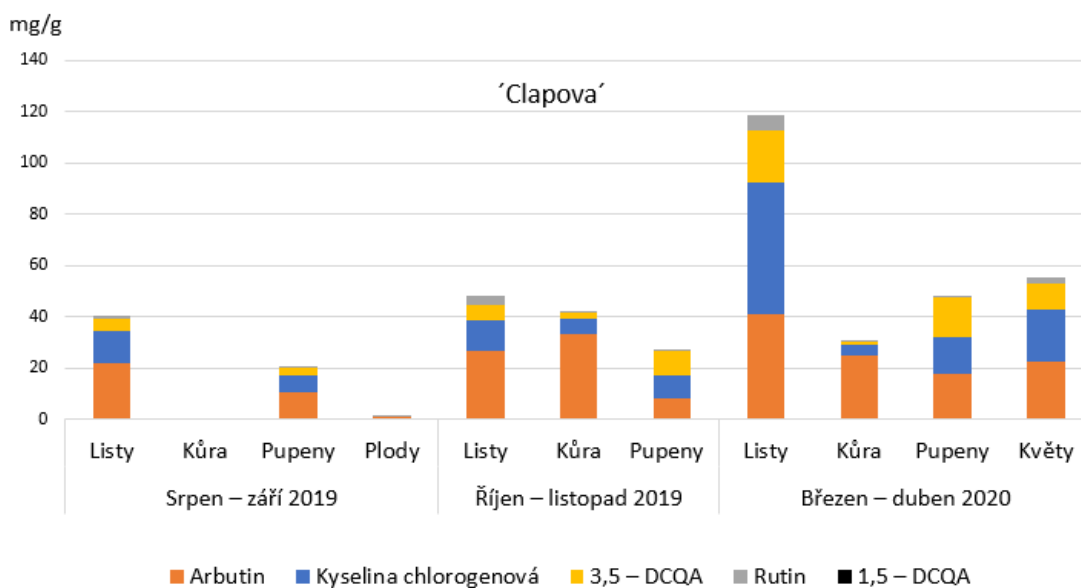
Tabulka 12 Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Clapova' v mg/g

'Clapova'	Srpen – září 2019				Říjen – listopad 2019			Březen – duben 2020			
	Listy	Kůra	Pupeny	Plody	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra	Pupeny	Květy
Arbutin	22,13	-	10,54	1,08	26,48	33,41	8,33	40,86	24,86	17,69	22,59
Kyselina chlorogenová	12,14	-	6,52	0,005	12,07	5,76	8,70	51,28	4,32	14,59	20,10
3,5 – DCQA	5,25	-	3,23	-	6,18	2,57	9,39	20,45	1,31	15,31	10,30
Rutin	0,94	-	0,06	0,005	3,56	0,56	0,33	5,74	0,17	0,69	2,46
1,5 – DCQA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celkem	40,46	-	20,35	1,09	48,29	42,3	26,75	118,33	30,66	48,28	55,45

\*DCQA ...kyselina dikafeoylchinová

Graf závislosti obsahu fenolických látek na období odběru a typu materiálu:

Graf 1 'Clapova' - obsah fenolických látek v mg/g



Z tabulky vyplývá, že u odrůdy 'Clapova' byl v jednotlivých obdobích nejvyšší obsah fenolických látek v listech. Ve všech vzorcích v období srpen – září bylo nejvíce

arbutinu. V období říjen – listopad bylo v listech nejvíce arbutinu, v kůře kyseliny chlorogenové a v pupenech kyseliny 3,5- dikafeoylchinové. V období březen – duben bylo v listech nejvíce kyseliny chlorogenové, v ostatních vzorcích bylo nejvíce arbutinu.

### 6.1.2 'Konference'

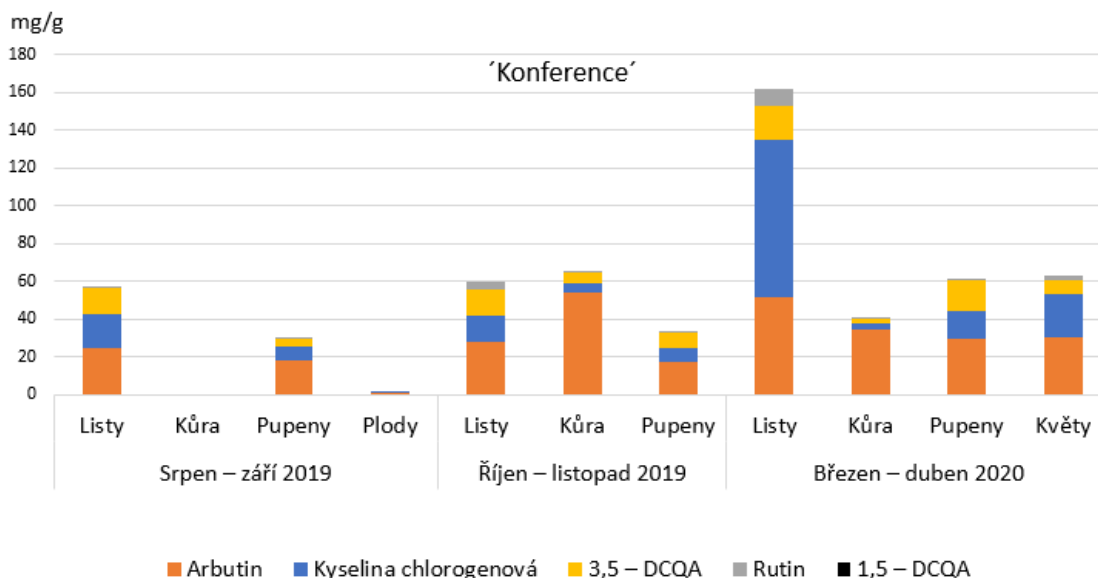
Tabulka 13 Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Konference' v mg/g

'Konference'	Srpen – září 2019				Říjen – listopad 2019			Březen – duben 2020			
	Listy	Kůra	Pupeny	Plody	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra	Pupeny	Květy
Arbutin	24,37	-	18,40	1,085	27,70	53,88	17,49	51,24	34,69	29,39	30,44
Kyselina chlorogenová	18,35	-	7,00	0,04	14,04	5,44	7,10	83,87	3,31	14,91	22,67
3,5 – DCQA	13,63	-	4,07	-	13,91	5,55	8,57	17,96	2,00	15,88	7,79
Rutin	1,19	-	0,07	0,00	4,51	0,52	0,42	8,62	0,49	0,49	2,53
1,5 – DCQA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celkem	57,54	-	29,54	1,13	60,16	65,39	33,58	161,69	40,49	60,67	63,43

\*DCQA ...kyselina dikafeoylchinová

Graf závislosti obsahu fenolických látek na období odběru a typu materiálu:

Graf 2 'Konference' - obsah fenolických látek v mg/g



Z tabulky vyplývá, že u odrůdy 'Konference' byl v obdobích srpen – září a březen – duben celkový obsah fenolických látek nejvyšší v listech. V období říjen – listopad byl nejvyšší v kůře. Ve vzorku listů v období březen – duben bylo nejvíce kyseliny chlorogenové, v ostatních vzorcích bylo nejvíce arbutinu.

### 6.1.3 'Williamsova červená'

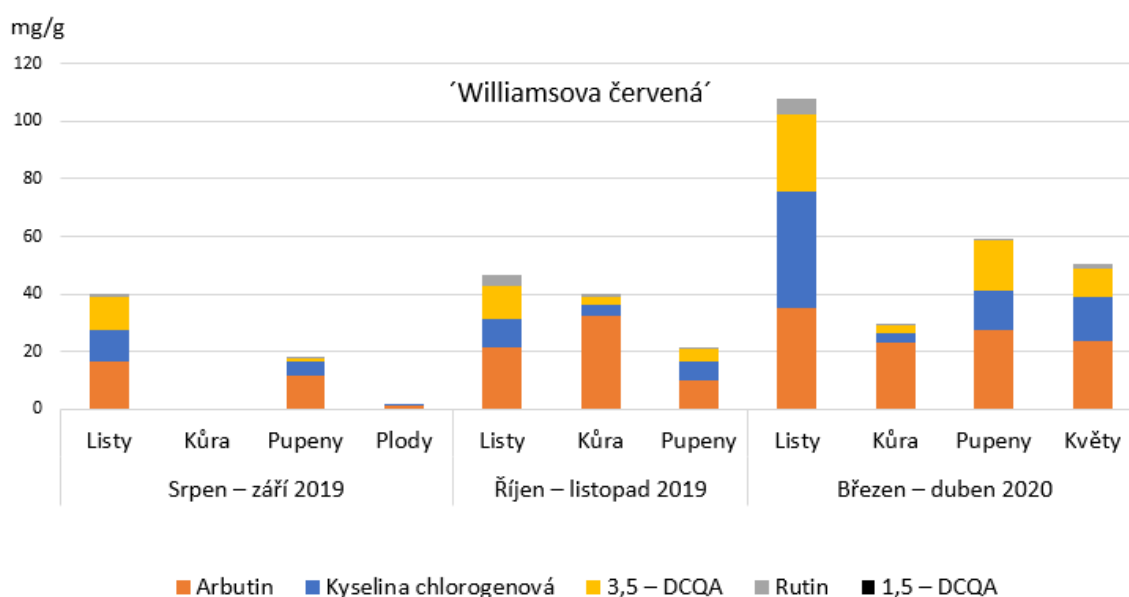
Tabulka 14 Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Williamsova červená' v mg/g

'Williamsova červená'	Srpen – září 2019				Říjen – listopad 2019			Březen – duben 2020			
	Listy	Kůra	Pupeny	Plody	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra	Pupeny	Květy
Arbutin	16,48	-	11,48	1,10	21,46	32,23	10,11	35,21	23,15	27,23	23,79
Kyselina chlorogenová	10,95	-	4,84	0,005	9,93	4,03	6,23	40,46	3,11	13,76	14,90
3,5 – DCQA	11,45	-	1,39	-	11,20	2,66	4,50	26,64	2,80	17,49	10,03
Rutin	0,88	-	0,03	0,00	3,73	0,92	0,39	5,54	0,45	0,51	1,61
1,5 – DCQA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celkem	39,76	-	17,74	1,11	46,32	39,84	21,23	107,85	29,51	58,99	50,33

\*DCQA ...kyselina dikafeoylchinová

Graf závislosti obsahu fenolických látek na období odběru a typu materiálu:

Graf 3 'Williamsova červená' - obsah fenolických látek v mg/g



Z tabulky vyplývá, že u odrůdy 'Williamsova červená' byl ve všech obdobích celkový obsah fenolických látek nejvyšší v listech. Ve vzorku listů v období březen – duben bylo nejvíce kyseliny chlorogenové, v ostatních vzorcích bylo nejvíce arbutinu.

#### 6.1.4 'Williamsova'

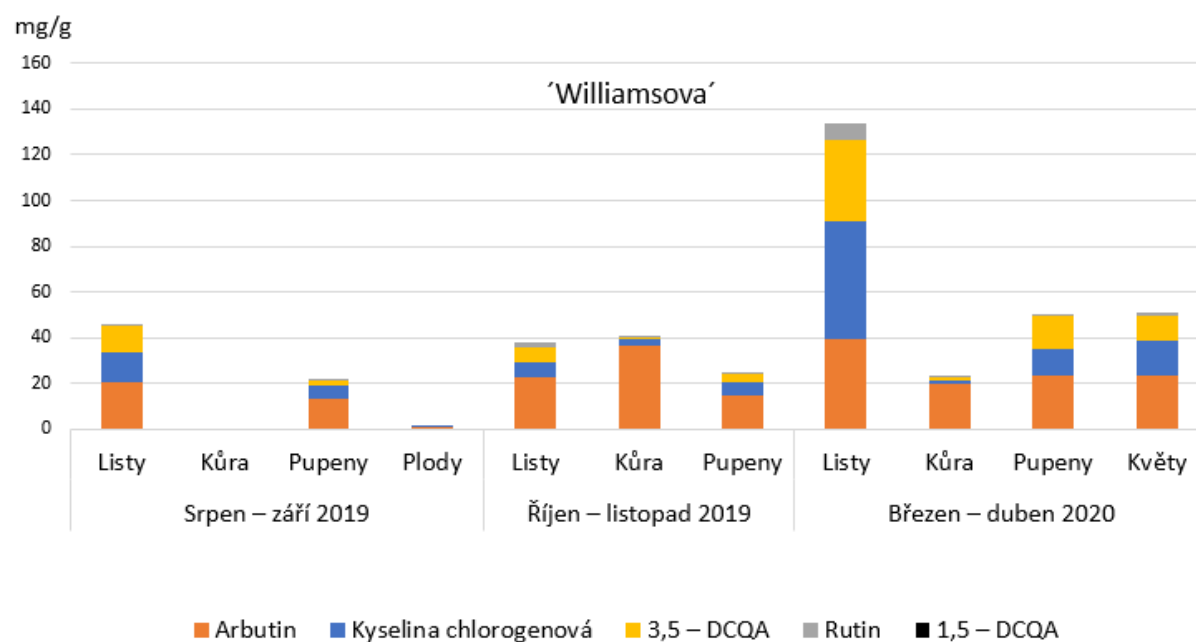
Tabulka 15 Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Williamsova' v mg/g

'Williamsova'	Srpen – září 2019				Říjen – listopad 2019			Březen – duben 2020			
	Listy	Kůra	Pupeny	Plody	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra	Pupeny	Květy
Arbutin	20,71	-	13,17	1,085	22,41	36,30	14,30	39,30	19,48	23,24	23,25
Kyselina chlorogenová	12,65	-	5,62	0,005	6,63	2,67	6,27	51,57	1,68	12,01	15,58
3,5 – DCQA	11,90	-	2,60	-	6,84	0,99	3,54	35,94	1,08	14,44	10,85
Rutin	0,74	-	0,03	0,00	1,79	0,98	0,14	6,97	0,43	0,73	1,53
1,5 – DCQA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celkem	46	-	21,42	1,09	37,67	40,94	24,25	133,78	22,67	50,42	51,21

\*DCQA ...kyselina dikafeoylchinová

Graf závislosti obsahu fenolických látek na období odběru a typu materiálu:

Graf 4 'Williamsova' - obsah fenolických látek v mg/g





Z tabulky vyplývá, že u odrůdy 'Williamsova' byl nejvyšší obsah fenolických látek v listech v období břez-en-duben. Ve většině vzorků převládá arbutin (kromě listů v období břez-en-duben).

### 6.1.5 'Charneuská'

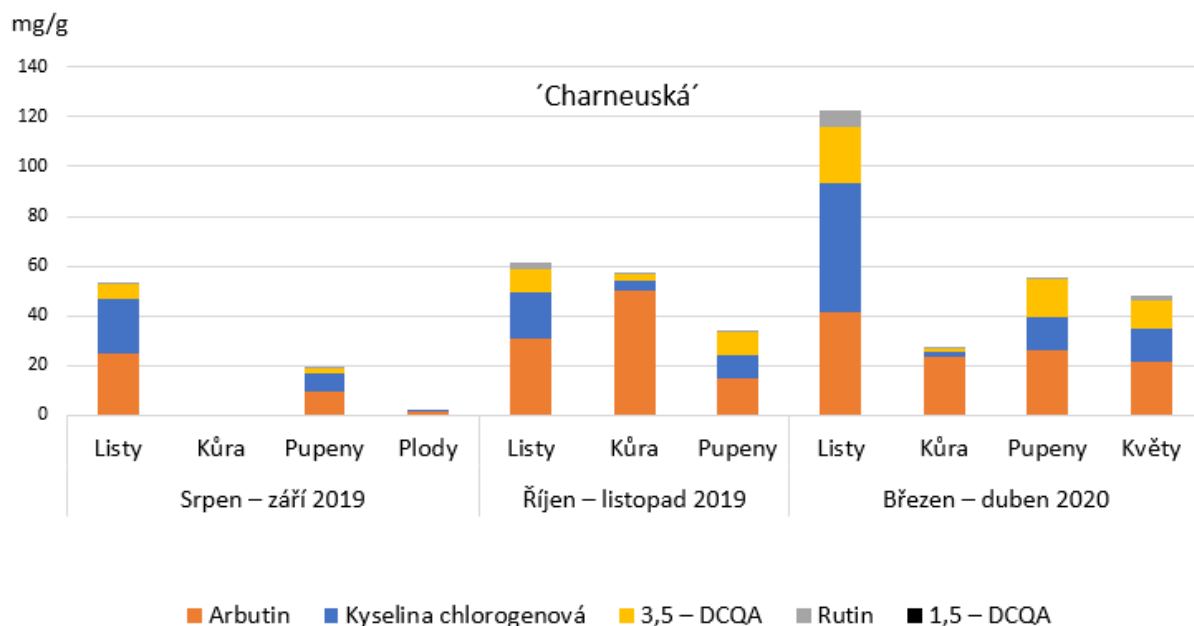
Tabulka 16 Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Charneuská' v mg/g

'Charneuská'	Srpen – září 2019				Říjen – listopad 2019			Březen – duben 2020			
	Listy	Kůra	Pupeny	Plody	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra	Pupeny	Květy
Arbutin	24,75	-	9,66	1,105	30,89	50,08	14,65	41,31	23,41	26,21	21,16
Kyselina chlorogenová	21,87	-	6,90	0,01	18,72	3,80	9,07	51,73	2,08	12,87	13,32
3,5 – DCQA	5,79	-	2,38	-	8,78	2,59	9,57	23,16	1,30	15,47	11,24
Rutin	0,78	-	0,04	0,00	2,77	0,40	0,53	6,61	0,24	0,68	2,23
1,5 – DCQA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celkem	53,19	-	18,98	1,12	61,16	56,87	33,82	122,81	27,03	55,23	47,95

\*DCQA ...kyselina dikafeoylchinová

Graf závislosti obsahu fenolických látek na období odběru a typu materiálu:

Graf 5 'Charneuská' - obsah fenolických látek v mg/g



Z tabulky vyplývá, že u odrůdy 'Charneuská' byl ve všech obdobích celkový obsah fenolických látek nejvyšší v listech. Ve většině vzorků převládá arbutin (kromě listů v období březen-duben, kdy částečně převládala kyselina chlorogenová).

### 6.1.6 'Lucasova'

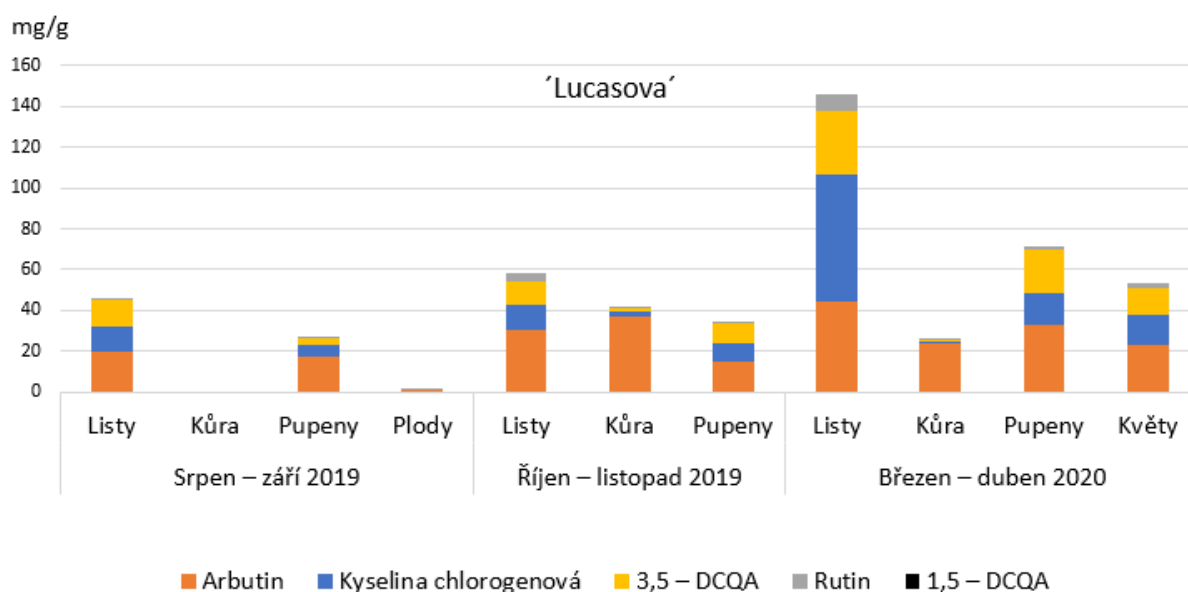
Tabulka 17 Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Lucasova' v mg/g

'Lucasova'	Srpen – září 2019				Říjen – listopad 2019			Březen – duben 2020			
	Listy	Kůra	Pupeny	Plody	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra	Pupeny	Květy
Arbutin	19,47	-	17,02	1,05	30,37	37,15	14,57	44,58	23,64	32,56	23,33
Kyselina chlorogenová	12,74	-	6,02	0,015	12,42	2,26	9,11	61,73	1,24	16,07	14,37
3,5 – DCQA	12,56	-	2,86	-	11,78	1,94	9,62	31,57	0,98	21,25	12,89
Rutin	1,09	-	0,02	0,01	3,35	0,41	0,51	8,48	0,19	1,13	2,52
1,5 – DCQA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celkem	45,86	-	25,92	1,08	57,92	41,76	33,81	146,36	26,05	71,01	53,11

\*DCQA ...kyselina dikafeoylchinová

Graf závislosti obsahu fenolických látek na období odběru a typu materiálu:

Graf 6 'Lucasova' - obsah fenolických látek v mg/g



Z tabulky vyplývá, že u odrůdy 'Lucasova' byl nejvyšší obsah fenolických látek v listech v období březen - duben. Ve většině vzorků převládá arbutin (kromě listů v období březen-duben).

### 6.1.7 'Higland'

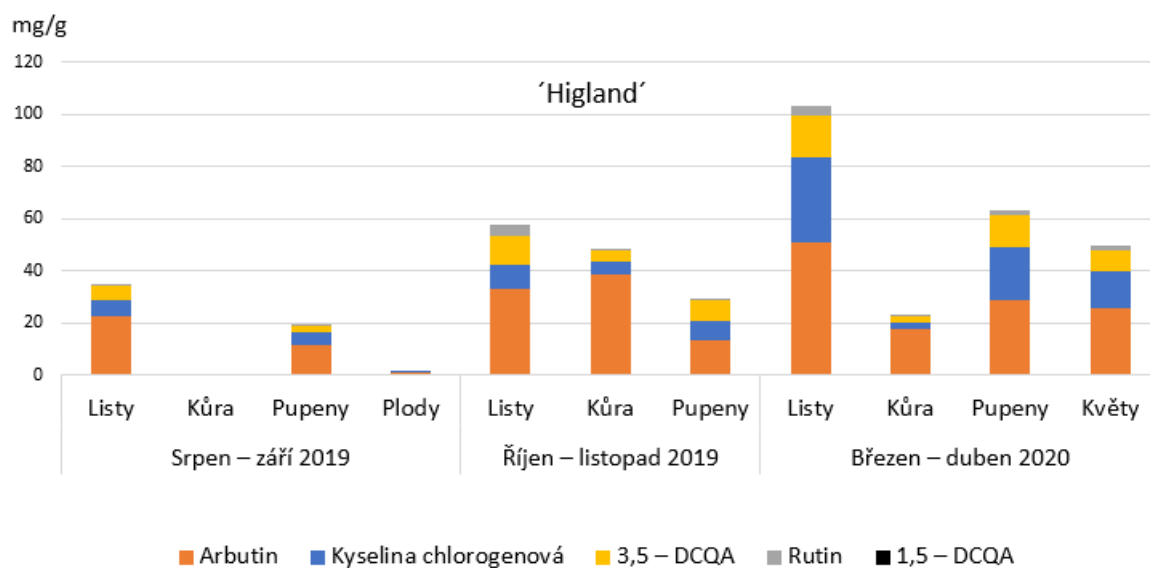
Tabulka 18 Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Higland' v mg/g

'Higland'	Srpen – září 2019				Říjen – listopad 2019			Březen – duben 2020			
	Listy	Kůra	Pupeny	Plody	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra	Pupeny	Květy
Arbutin	22,89	-	11,89	1,095	33,07	38,62	13,56	51,27	17,64	28,79	25,65
Kyselina chlorogenová	5,75	-	4,78	0,01	9,35	4,85	7,36	32,47	2,77	20,19	14,09
3,5 – DCQA	5,68	-	2,07	-	11,18	4,70	7,92	15,66	2,10	12,64	8,31
Rutin	0,64	-	0,04	0,00	4,32	0,45	0,53	4,01	0,08	1,39	1,70
1,5 – DCQA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celkem	34,96	-	18,78	1,11	57,92	48,62	29,37	103,41	22,59	63,01	49,75

\*DCQA ...kyselina dikafeoylchinová

Graf závislosti obsahu fenolických látek na období odběru a typu materiálu:

Graf 7 'Higland' - obsah fenolických látek v mg/g



Z tabulky vyplývá, že u odrůdy 'Higland' byl ve všech obdobích celkový obsah fenolických látek nejvyšší v listech. Ve všech vzorcích bylo nejvíce arbutinu.

### 6.1.8 'Grosdemange'

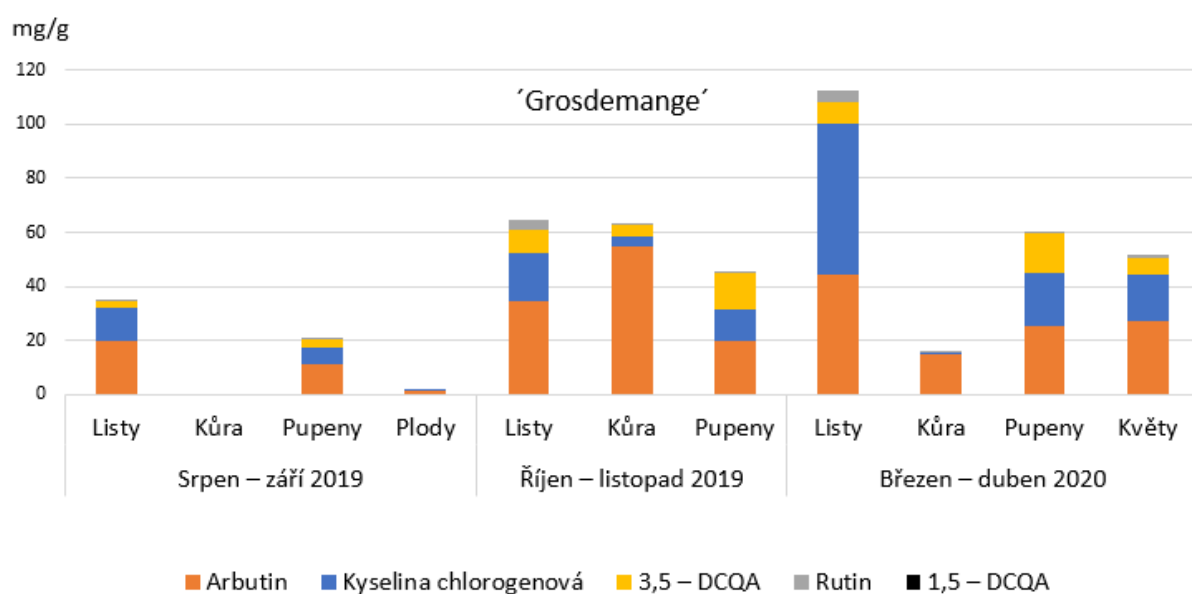
Tabulka 19 Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Grosdemange' v mg/g

'Grosdemange'	Srpen – září 2019				Říjen – listopad 2019			Březen – duben 2020			
	Listy	Kůra	Pupeny	Plody	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra	Pupeny	Květy
Arbutin	19,87	-	11,08	1,115	34,45	54,61	19,67	44,40	15,06	25,19	26,81
Kyselina chlorogenová	11,86	-	6,37	0,015	17,93	3,56	11,81	55,99	0,39	19,74	17,24
3,5 – DCQA	2,90	-	2,95	-	8,34	4,45	13,48	7,73	0,23	14,75	6,22
Rutin	0,56	-	0,02	0,00	3,79	0,51	0,34	4,54	0,06	0,54	1,26
1,5 – DCQA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celkem	35,19	-	20,42	1,13	64,51	63,13	45,3	112,66	15,74	60,22	51,53

\*DCQA ...kyselina dikafeoylchinová

Graf závislosti obsahu fenolických látek na období odběru a typu materiálu:

Graf 8 'Grosdemange' - obsah fenolických látek v mg/g



Z tabulky vyplývá, že u odrůdy 'Grosdemange' byl ve všech obdobích celkový obsah fenolických látek nejvyšší v listech. Ve většině vzorků převládá arbutin (kromě listů v období březen-duben).

### 6.1.9 'Thiriotova'

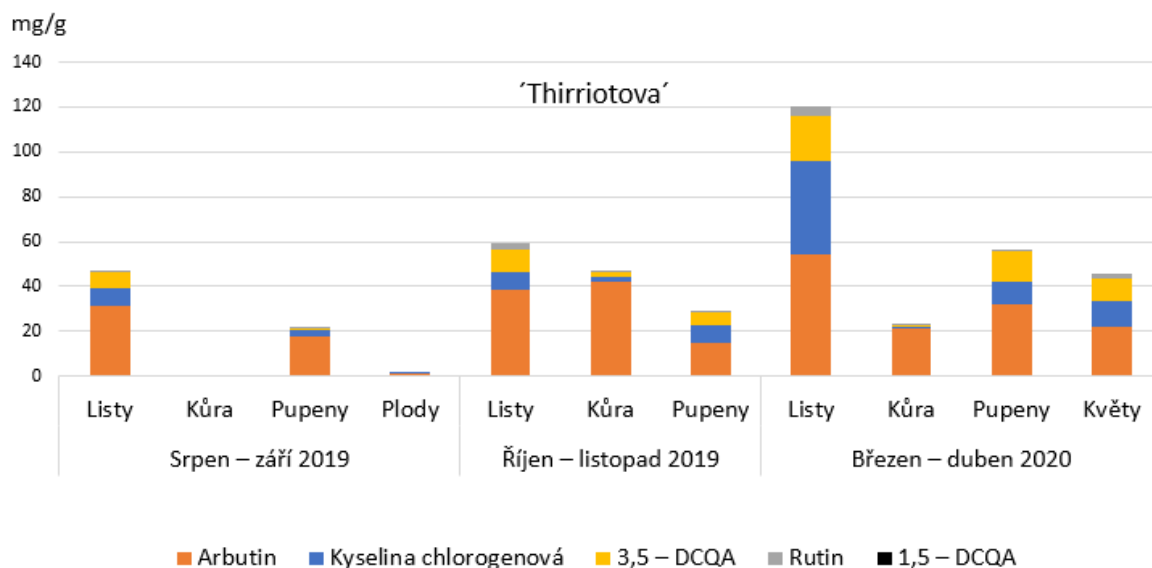
Tabulka 20 Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Thirriotova' v mg/g

'Thirriotova'	Srpen – září 2019				Říjen – listopad 2019			Březen – duben 2020			
	Listy	Kůra	Pupeny	Plody	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra	Pupeny	Květy
Arbutin	31,45	-	17,52	1,06	38,73	42,32	14,79	54,42	20,98	32,07	22,00
Kyselina chlorogenová	7,51	-	2,86	0,05	7,41	2,23	7,98	41,25	0,84	9,86	11,82
3,5 – DCQA	7,51	-	0,59	-	10,19	1,94	5,86	20,49	0,64	13,96	9,70
Rutin	0,68	-	0,01	0,00	2,78	0,23	0,45	4,45	0,20	0,63	1,92
1,5 – DCQA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celkem	47,15	-	20,98	1,11	59,11	46,72	29,08	120,61	22,66	56,52	45,44

\*DCQA ...kyselina dikafeoylchinová

Graf závislosti obsahu fenolických látek na období odběru a typu materiálu:

Graf 9 'Thirriotova' - obsah fenolických látek v mg/g



Z tabulky vyplývá, že u odrůdy 'Thirriotova' byl celkový obsah fenolických látek nejvyšší v listech v období březen – duben. Ve všech vzorcích bylo nejvíce arbutinu.

### 6.1.10 'General Leclerc'

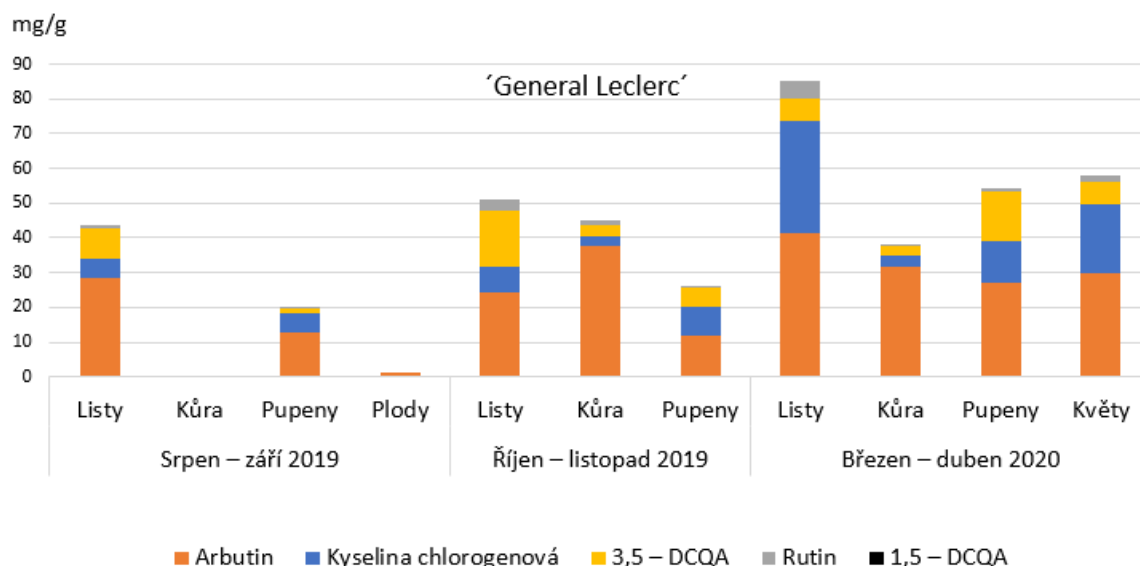
Tabulka 21 Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'General Leclerc' v mg/g

'General Leclerc'	Srpen – září 2019				Říjen – listopad 2019			Březen – duben 2020			
	Listy	Kůra	Pupeny	Plody	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra	Pupeny	Květy
Arbutin	28,29	-	12,56	1,09	24,23	37,49	12,03	41,57	31,90	27,06	29,68
Kyselina chlorogenová	5,90	-	5,54	0,00	7,45	2,98	8,18	32,29	2,97	12,11	19,90
3,5 – DCQA	8,44	-	1,39	-	15,94	3,40	5,47	6,26	2,91	14,24	6,36
Rutin	0,88	-	0,02	0,00	3,56	1,03	0,39	4,92	0,21	0,82	2,27
1,5 – DCQA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celkem	43,51	-	19,51	1,09	51,18	44,9	26,07	85,04	37,99	54,23	58,21

\*DCQA ...kyselina dikafeoylchinová

Graf závislosti obsahu fenolických látek na období odběru a typu materiálu:

Graf 10 'General Leclerc' - obsah fenolických látek v mg/g



Z tabulky vyplývá, že u odrůdy 'General Leclerc' byl ve všech obdobích celkový obsah fenolických látek nejvyšší v listech. Ve všech vzorcích bylo nejvíce arbutinu.

### 6.1.11 Štěpka

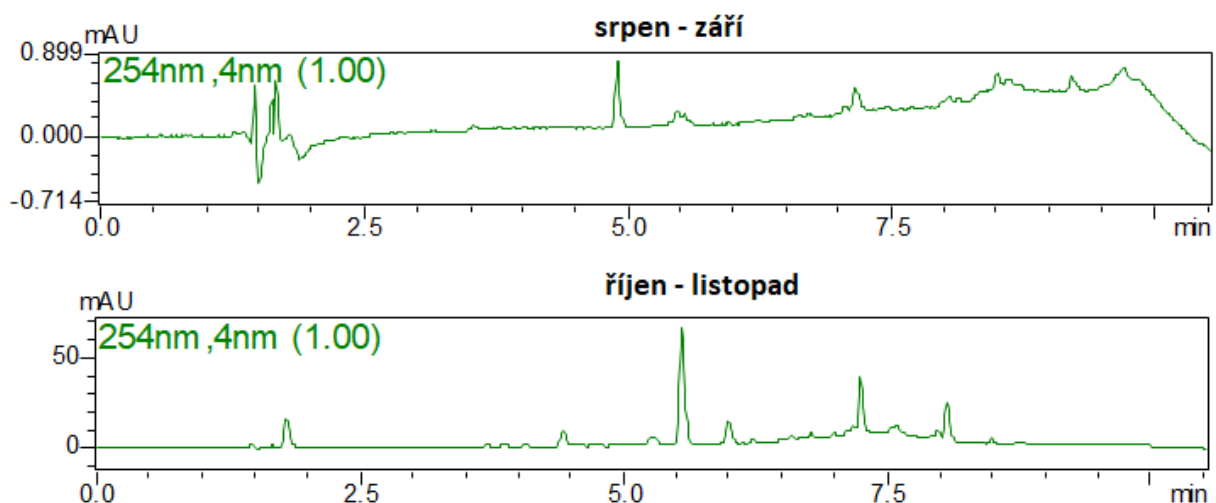
Tabulka 22 Koncentrace fenolických látek ve vzorku štěpky v mg/g

štěpka	mg/g
Arbutin	19,51
Kyselina chlorogenová	2,24
3,5 – DCQA	1,24
Rutin	0,09
1,5 – DCQA	-
Celkem	23,08

\*DCQA ...kyselina dikafeoylchinová

Ve vzorku štěpky byl nejhojněji zastoupen arbutin, následovala kyselina chlorogenová, další byla kyselina 3,5- dikafeoylchinová a nejméně bylo rutinu. Kyselina 1,5- dikafeoylchinová se ve vzorku nevyskytovala.

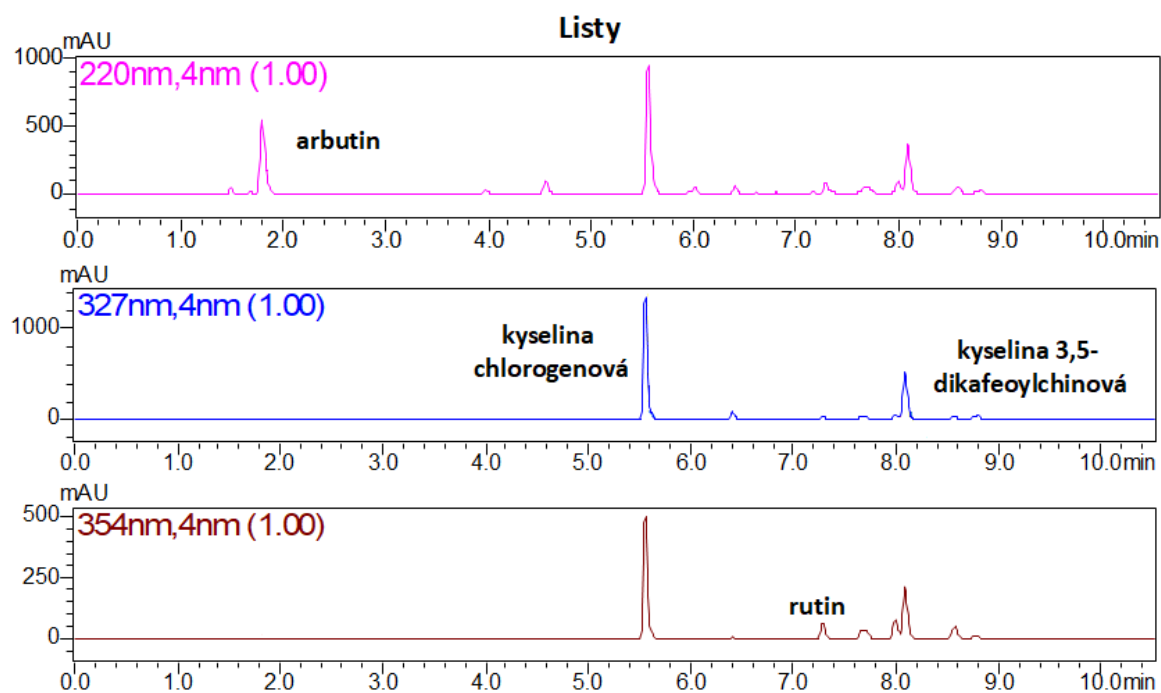
V období srpen – září došlo ke špatnému odběru vzorků kůry (byla odebrána suchá kůra kmene, která neobsahuje dané analyty, viz chromatogram na obr. 13). Tato kůra bude odebrána znovu v období srpen – září 2020.



Obrázek 13 Příklad špatného odběru kůry (‘Clapova’) v období srpen – září v porovnání s odběrem říjen – listopad

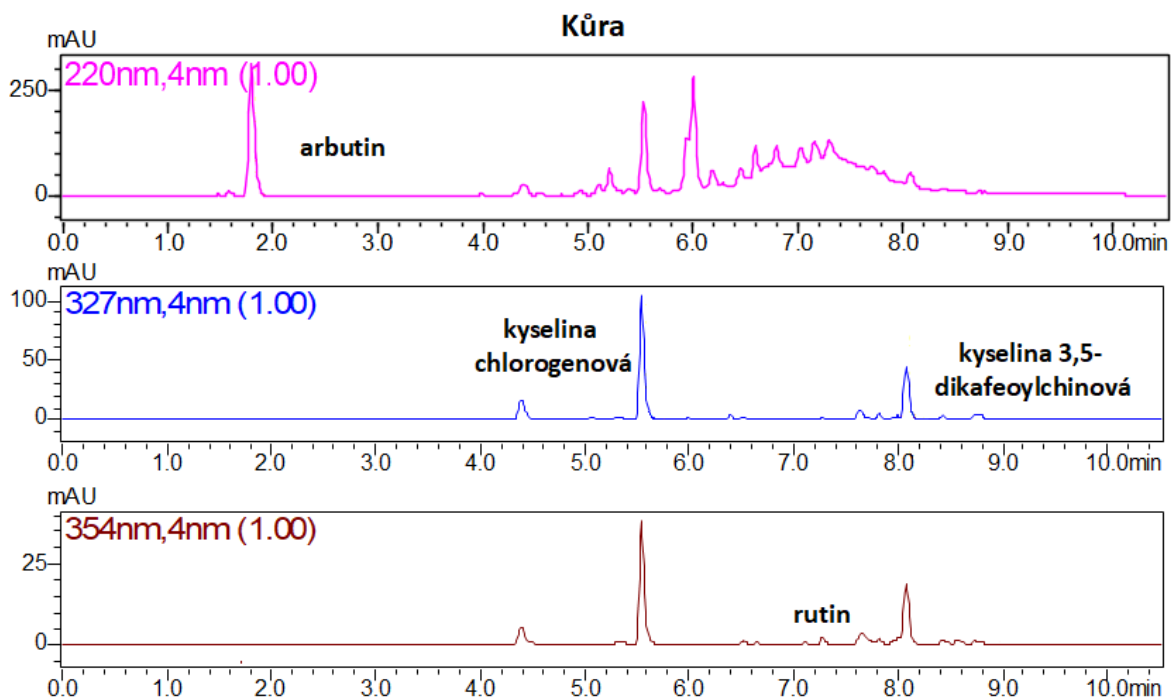
Kyselina 1,5- dikafeoylchinová nebyla detekována ani u jednoho vzorku. U plodů nebyla detekována ani kyselina 3,5- dikafeoylchinová. U všech odrůd bylo celkové množství fenolických látek nejvyšší v listech v období březen – duben 2020, nejnižší bylo v plodech. Celkové množství fenolických látek u listů se pohybovalo v rozmezí 34,96 – 161,69 mg/g, u kůry 15,74 – 65,39 mg/g, u pupenů 17,74 – 71,01 mg/g, u plodů 1,075 – 1,13 mg/g a u květů 45,44 – 63,43 mg/g. Nejhojněji byl zastoupen arbutin a kyselina chlorogenová. Množství arbutinu se pohybovalo v rozmezí 1,05 – 54,42 mg/g. Kyselina chlorogenová se pohybovala v rozmezí 0 – 83,87 mg/g, 3,5- dikafeoylchinová kyselina v rozmezí 0,23 – 35,94 mg/g a rutin v rozmezí 0 – 8,62 mg/g.

### 6.1.12 Příklady chromatografického záznamu obsahu fenolických látek

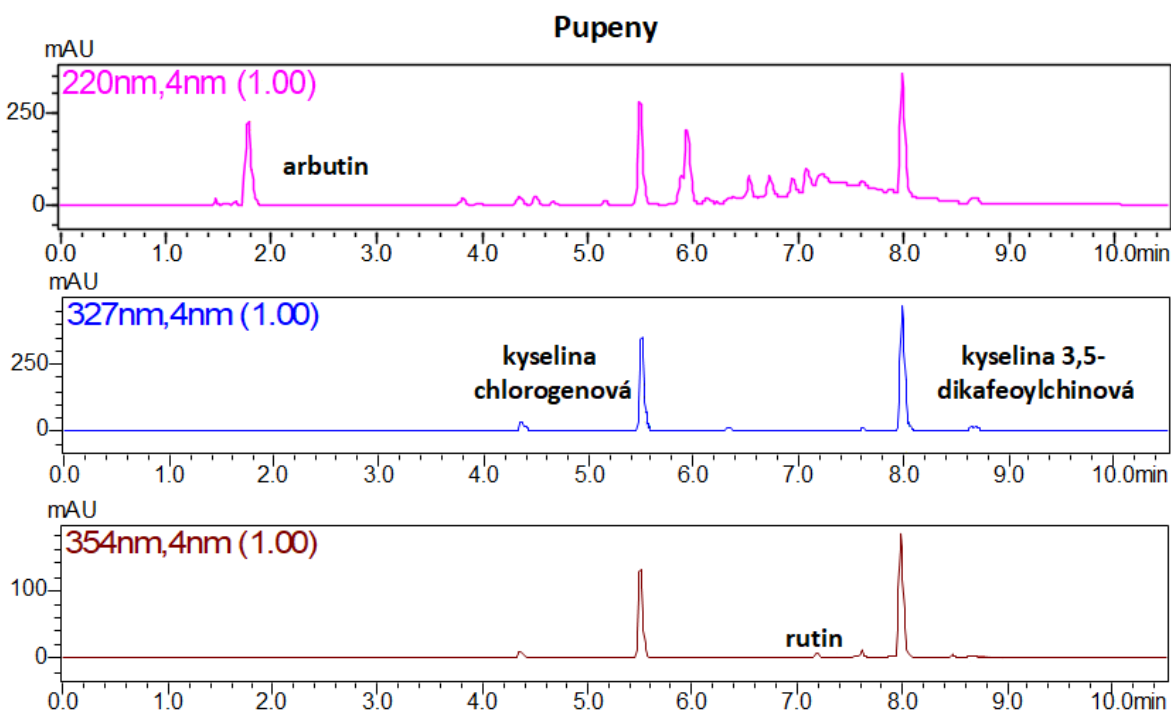


Obrázek 14 Chromatogramy vzorku listů odrůdy 'Clapova' v období březen – duben 2020

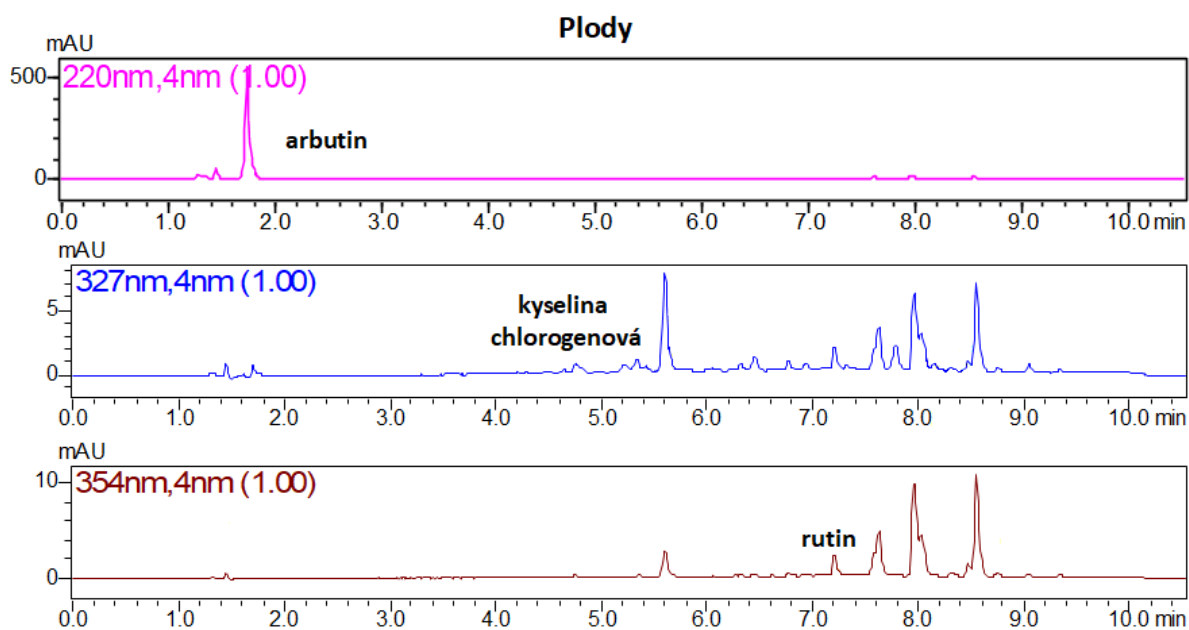




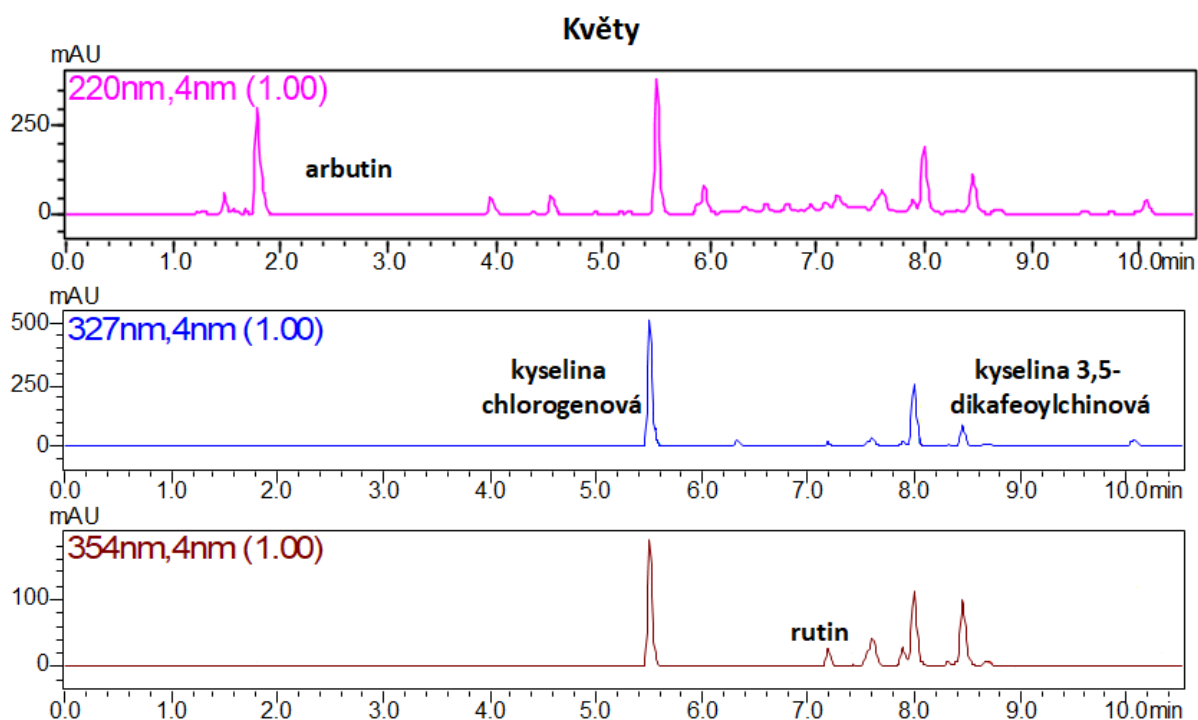
Obrázek 15 Chromatogramy vzorku kůry odrůdy 'Clapova' v období březen – duben 2020



Obrázek 16 Chromatogramy vzorku pupenů odrůdy 'Clapova' v období březen – duben 2020



Obrázek 17 Chromatogramy vzorku plodů odrůdy 'Člapová' v období srpen – září 2019



Obrázek 18 Chromatogramy vzorku květů odrůdy 'Člapová' v období březen – duben 2020

## 6.2 Celková antioxidační aktivita v jednotlivých materiálech

Tabulka 23 Celková antioxidační aktivita v  $\mu\text{C}$

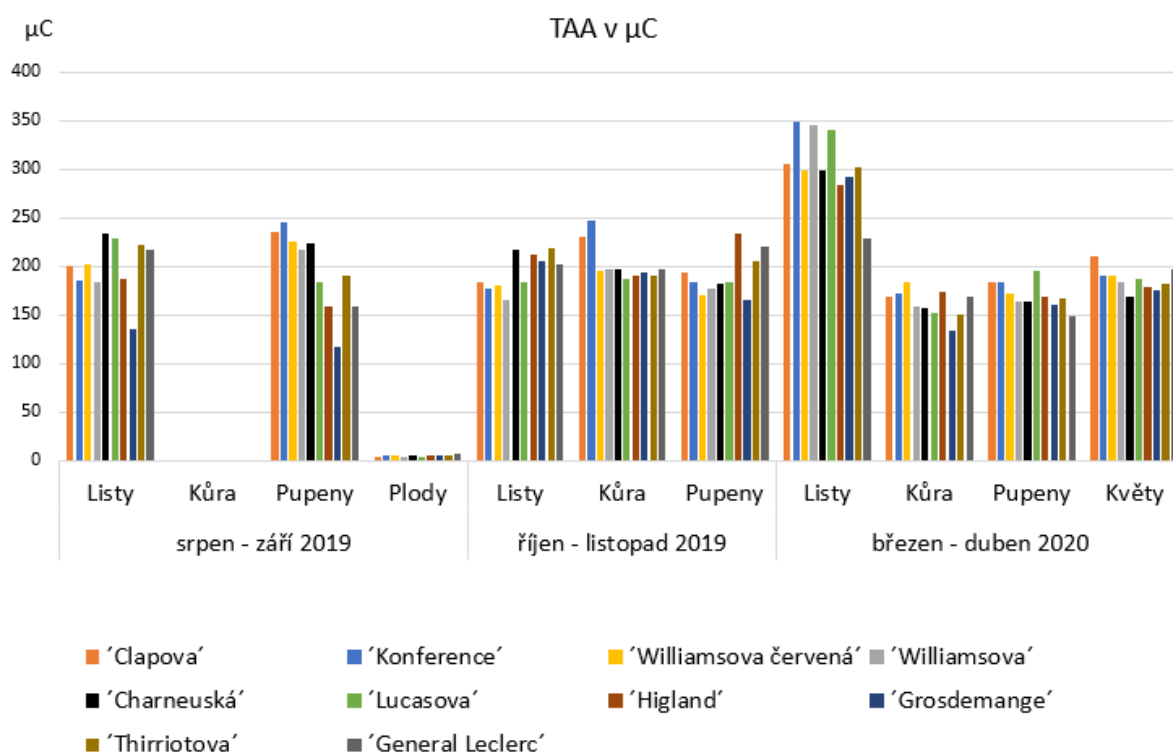
Odrůda	Srpen – září 2019				Říjen – listopad 2019			Březen – duben 2020			
	Listy	Kůra	Pupeny	Plody	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra	Pupeny	Květy
‘Clapova’	199,39	-	235,00	3,831	182,94	230,30	193,80	305,06	168,67	183,59	210,06
‘Konference’	184,72	-	245,05	5,403	176,96	247,60	183,50	349,22	172,56	183,48	190,49
‘Williamsova červená’	201,26	-	224,77	4,453	179,90	195,29	170,97	299,32	183,63	172,62	189,38
‘Williamsova’	183,11	-	216,05	3,685	164,50	196,83	176,18	344,82	158,23	163,96	183,87
‘Charneuská’	233,00	-	224,29	4,422	216,43	196,24	182,50	297,97	156,78	163,92	169,27
‘Lucasova’	227,85	-	183,90	3,911	183,43	187,37	184,13	339,45	151,54	195,03	187,31
‘Higland’	187,44	-	158,61	4,718	212,37	190,38	234,32	283,45	174,34	168,89	177,74
‘Grosdemange’	135,81	-	116,89	5,235	205,93	193,45	165,76	292,23	133,46	160,40	174,53
‘Thirriotova’	221,80	-	190,42	5,820	218,97	190,96	204,67	302,66	150,46	166,66	181,25
‘General Leclerc’	217,41	-	159,08	7,621	201,83	197,10	220,11	228,58	169,19	149,30	196,58
								Štěpka		126,83	

\*Při analýze nebyly extrakty plodů ředěny. Pro přehlednost jsou výsledky těchto plodů vyděleny 20, aby došlo ke sjednocení s ostatními extrakty.

Rovněž byla stanovena celková antioxidační aktivita pomocí průtokové metody s elektrochemickou detekcí. Jednotlivé výsledky lze téměř okamžitě použít k rychlému meziodrůdovému porovnání z hlediska TAA. Extrakty (kromě plodů) byly 20krát zředěny, a proto by skutečná hodnota v  $\mu\text{C}$  byla 20krát vyšší, ale pro meziodrůdové porovnání není třeba hodnotu zvyšovat.

Grafické znázornění závislosti celkové antioxidační aktivity na daném období:

**Graf 11 Celková antioxidační aktivita v  $\mu\text{C}$**



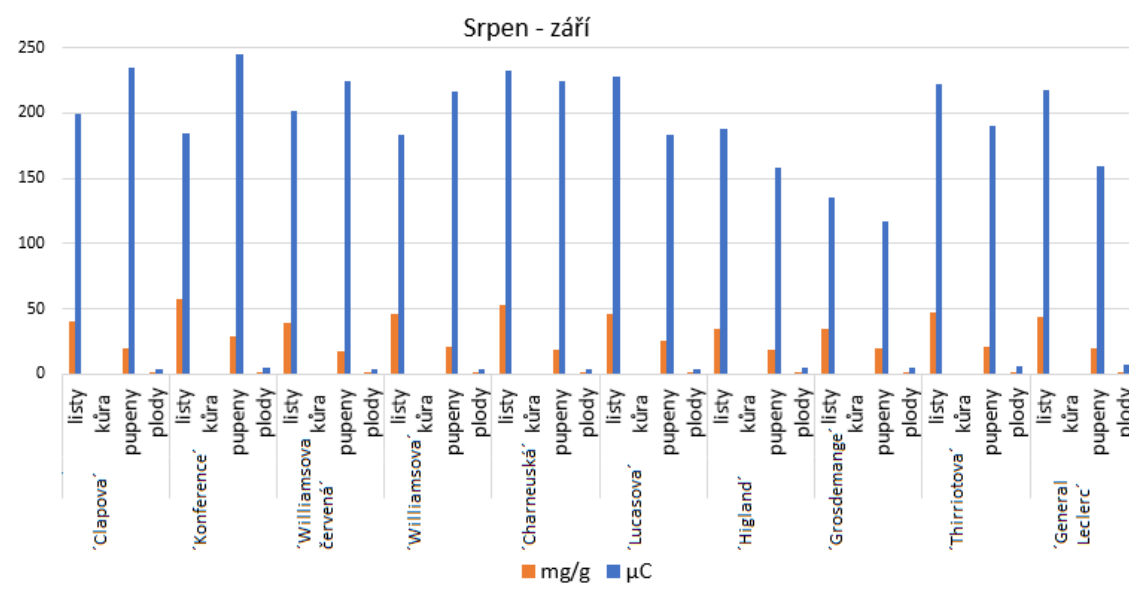
TAA byla nejvyšší ve vzorcích listů v období březen – duben (nejvyšší byla u odrůdy 'Konference'). Nejnižší byla u plodů. U listů se TAA pohybovala v rozmezí 135,81 – 349,22  $\mu\text{C}$ , u kůry v rozmezí 133,46 – 247,60  $\mu\text{C}$ , u pupenů 116,89 – 245,05  $\mu\text{C}$ , u plodů 3,685 – 7,621  $\mu\text{C}$  a u květů 169,27 – 210,06  $\mu\text{C}$ .

### 6.3 Vztah celkového množství fenolických látek a TAA

V následujících tabulkách je v jednotlivých obdobích porovnáváno celkové množství fenolických látek s TAA u vzorků všech odrůd.

Grafické srovnání HPLC (mg/g) a TAA ( $\mu\text{C}$ ) v období srpen – září 2019:

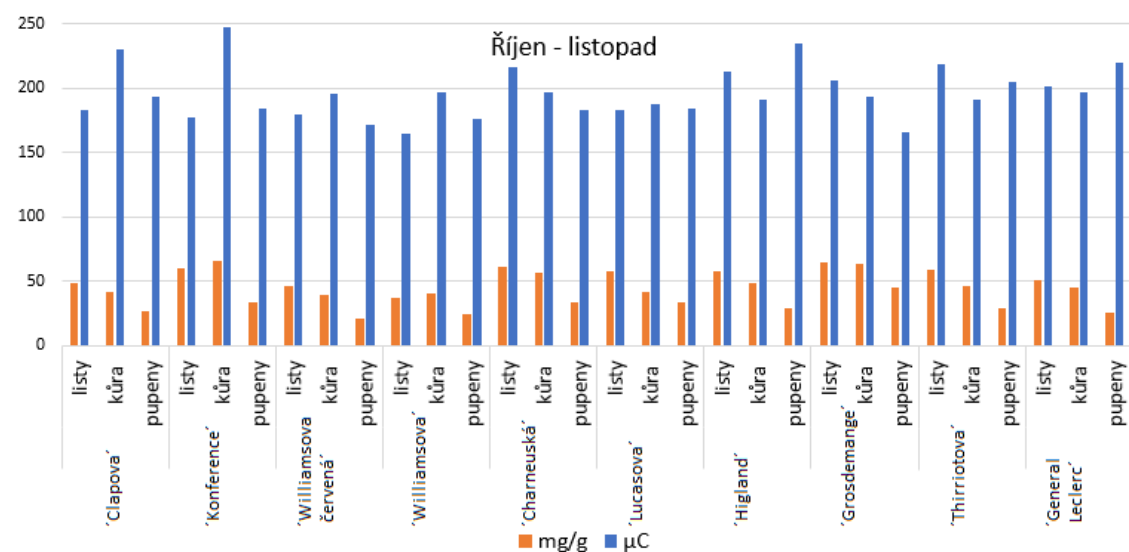
**Graf 12** Porovnání celkového množství fenolických látek v mg/g a TAA v  $\mu\text{C}$  v období srpen – září



Z grafu je patrné, že v období srpen – září 2020 je celkové množství fenolických látek u všech odrůd nejvyšší v listech, kdežto TAA je u odrůd 'Clapova', 'Konference', 'Williamsova červená' a 'Williamsova' nejvyšší v pupenech, u ostatních odrůd je nejvyšší v listech. U všech odrůd je celkové množství fenolických látek i TAA nejnižší v plodech.

Grafické srovnání HPLC (mg/g) a TAA ( $\mu\text{C}$ ) v období říjen – listopad 2019:

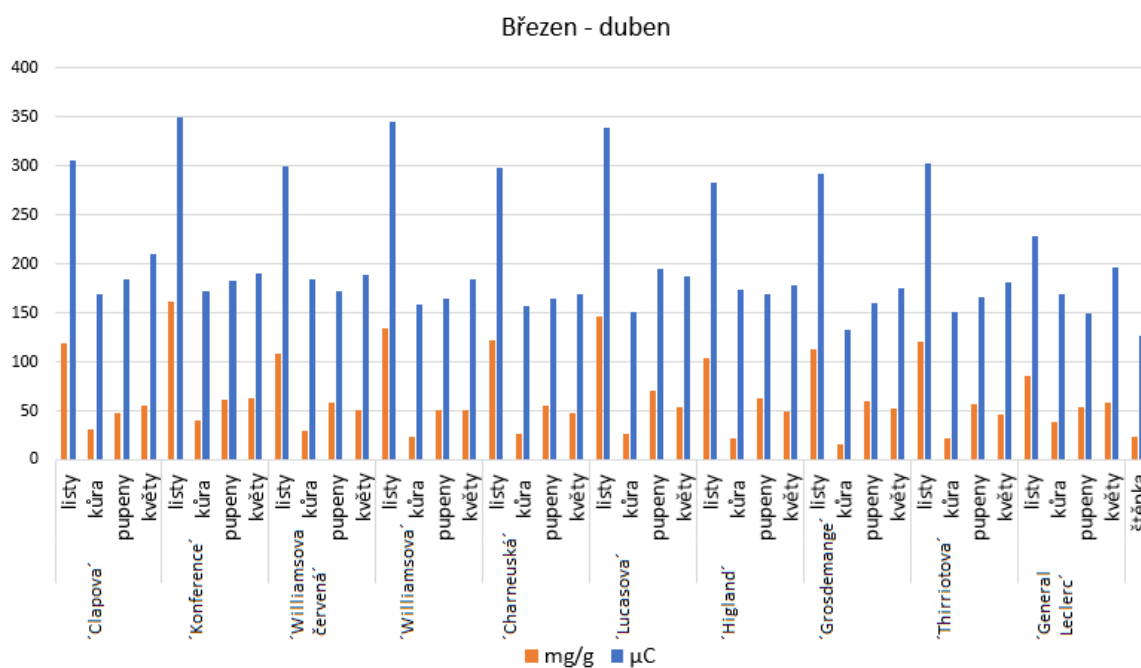
**Graf 13** Porovnání celkového množství fenolických látek v mg/g a TAA v  $\mu\text{C}$  v období říjen – listopad



Z grafu je patrné, že je u většiny odrůd celkové množství fenolických látek nejvyšší v listech. Jen u odrůd 'Konference' a 'Williamsova' je nejvyšší v kůře. TAA byla u odrůd 'Charneuská', 'Grosdemange' a 'Thirriotova' nejvyšší v listech, u odrůd 'Higland' a 'General Leclerc' byla nejvyšší v pupenech a u ostatních odrůd byla nejvyšší v kůře.

Grafické srovnání HPLC (mg/g) a TAA ( $\mu\text{C}$ ) v období březen – duben 2020:

**Graf 14** Porovnání celkového množství fenolických látek v mg/g a TAA v  $\mu\text{C}$  v období březen – duben



Z grafu je patrné, že je u všech odrůd celkové množství fenolických látek i TAA nejvyšší v listech.

## 7. DISKUSE A ZÁVĚR

V této diplomové práci byly stanovovány fenolické látky v listech, kůře, pupenech, plodech, květech a štěpce deseti odrůd rodu *Pyrus*, a to odrůd 'Clapova', 'Konference', 'Williamsova červená', 'Williamsova', 'Charneuská', 'Lucasova', 'Higland', 'Grosdemange', 'Thiriotova' a 'General Leclerc'. Konkrétně byly stanovovány tyto látky: arbutin, kyselina chlorogenová, kyselina 1,5- dikafeoylchinová, kyselina 3,5- dikafeoylchinová a rutin. Sběr vzorků a jejich analýza probíhala ve třech obdobích, a to srpen – září 2019, říjen – listopad 2019 a březen – duben 2020. U všech extraktů byla rovněž zjištěna celková antioxidační aktivita.

K měření extraktů byla použita již dříve validovaná HPLC metoda s kolonou ASCENTIS Express RP-Amide 150×4.6 mm, 2.7 μm. Byla využita gradientová eluce s mobilní fází tvořenou organickou složkou (ACN) a vodnou složkou s kyselinou fosforečnou (pH = 2,2). K detekci byl využit DAD detektor při vlnových délkách 220 nm, 327 nm a 354 nm. Teplota kolonového prostoru byla 30 °C, nástřik byl 1 μl (u plodů 5 μl z důvodů nižšího obsahu fenolických látek) a průtoková rychlost 1 ml/min. U všech připravených extraktů byla zjištěna celková antioxidační aktivita průtokovou metodou s elektrochemickou (CoulArray) detekcí.

U všech odrůd bylo celkové množství fenolických látek nejvyšší v listech v období březen – duben 2020. V tomto období byla zjištěna i nejvyšší celková antioxidační aktivita. Nejnížší množství fenolických látek bylo v plodech a ty měly zároveň nejnížší antioxidační aktivitu. Hlavními fenolickými sloučeninami ve všech vzorcích byly arbutin a kyselina chlorogenová. Naopak nejmenší obsah byl zjištěn u rutinu. Kyselina 1,5- dikafeoylchinová nebyla detekována ani u jednoho vzorku. U plodů nebyla detekována ani kyselina 3,5- dikafeoylchinová.

Nejvíce bohatou odrůdou z hlediska fenolických látek a zároveň antioxidační aktivity je odrůda 'Konference'. Bylo zjištěno, že listy této odrůdy obsahuje v období březen - duben 2020 celkem 161,69 mg/g fenolických látek, z toho kyselina chlorogenová zaujímala 83,87 mg/g a arbutin 51,24 mg/g. V kůře bylo zjištěno 40,49 mg/g, v pupenech 60,67 mg/g a v květech 63,43 mg/g všech fenolických látek.

Plod odrůdy 'Konference' obsahoval pouze 1,13 mg/g fenolických látek, tedy signifikantně méně než v rostlinném materiálu.

Z této diplomové práce je patrné, že odpadový materiál z hrušně má mnohonásobně vyšší množství fenolických látek než plody. Toto zjištění se shoduje se studií *Bulduk a kol. (2016)*, kde byl stanovován arbutin v listech, kůře a plodech [8]. Studie *Sasaki a kol. (2014)* došla také ke stejnému závěru [36]. Ve studiích *Andreotti a kol. (2006)* [6] a *Colaric a kol. (2007)* [7] byly jako hlavní složky v listech identifikovány arbutin a kyselina chlorogenová, stejně jako v této diplomové práci.

Doba stanovení fenolických látek v extraktech pomocí HPLC je 10,51 minut. Tomu předchází nutná identifikace analytů, volba kolony a optimalizace metody. Doba analýzy stanovení všech antioxidantů pomocí FIA/CoulArray je 1,1 minut bez nutnosti identifikace, volby kolony (není přítomná) či složité optimalizace. Z toho vyplývající výhodou je velmi rychlé stanovení celkové antioxidační aktivity extraktů bez složité instrumentace a možnost rychlého meziodrůdového srovnání. Nevýhodou je však nemožnost separace a identifikace jednotlivých látek. Výhodou kombinace HPLC stanovení a zároveň použití levné a rychlé FIA/CoulArray analýzy je tak získání kompletních informací o zkoumaných extraktech.

Výhodou odpadového materiálu, jako jsou listy, je jejich snadná dostupnost, vysoký obsah fenolických látek a jednoduchost zpracování. Kůra, pupeny a květy tak snadno dostupné nejsou a představují zásah do stromu. Z praktického hlediska se nabízí možnost extrakce listů horkou vodou a využití v podobě přípravy čajů. Ve studii *Xu a kol. (2008)* byly extrahovány fenolické kyseliny a některé minerály z citrusových slupek. Výsledek stanovení antioxidační kapacity ukázal, že extrakt s horkou vodou měl téměř stejnou kapacitu jako methanolový extrakt. Extrakce horkou vodou byla tedy pro fenolické kyseliny účinná [37].

Vzhledem k tomu, že je v odpadovém materiálu mnohonásobně vyšší množství fenolických látek než v plodech a zároveň vykazují vysokou antioxidační aktivitu, mohl by být tento materiál recyklován a sloužit jako lehce dostupný zdroj fenolických látek a jiných antioxidantů pro výrobu potravních suplementů s pozitivním zdravotním



efektem. Dalším možným využitím je příprava kosmetických preparátů, jako jsou například krémy s obsahem arbutinu pro zesvětlování odstínu pokožky.

## 8. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Seznam obsahových látek v plodech evropských hrušní [2].....	23
Tabulka 2 Souhrn předchozích studií a chromatografických metod stanovení .....	30
Tabulka 3 Chromatografický systém.....	34
Tabulka 4 Linearita, výtěžnost, přesnost .....	36
Tabulka 5 Opakovatelnost – Kyselina 3,5- dikafeoylchinová, kyselina 1,5- dikafeoylchinová, rutin .....	36
Tabulka 6 Opakovatelnost – Arbutin a kyselina chlorogenová .....	36
Tabulka 7 Parametry chromatografické separace.....	37
Tabulka 8 Porovnání účinku délky ultrazvukové lázně a typu extrakčního činidla .....	38
Tabulka 9 Porovnání koncentrací kyseliny octové.....	39
Tabulka 10 Přehled testovaných odrůd a popis barvy plodu .....	42
Tabulka 11 Systém pro stanovení celkové antioxidační aktivity .....	42
Tabulka 12 Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Clapova' v mg/g.....	45
Tabulka 13 Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Konference' v mg/g....	46
Tabulka 14 Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Williamsova červená' v mg/g.....	47
Tabulka 15 Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Williamsova' v mg/g...	48
Tabulka 16 Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Charneuská' v mg/g ...	49
Tabulka 17 Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Lucasova' v mg/g.....	50
Tabulka 18 Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Higland' v mg/g .....	51
Tabulka 19 Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Grosdemange' v mg/g	52

Tabulka 20 Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Thirriotova' v mg/g.....	53
Tabulka 21 Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'General Leclerc' v mg/g .....	54
Tabulka 22 Koncentrace fenolických látek ve vzorku štěpky v mg/g .....	55
Tabulka 23 Celková antioxidační aktivita v $\mu\text{C}$ .....	59

## 9. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Schéma syntézy fenolických látek [9].....	16
Obrázek 2 Strukturní vzorec arbutinu [11]. .....	17
Obrázek 3 Strukturní vzorec kyseliny chlorogenové [15]. .....	20
Obrázek 4 Příklady strukturních vzorců dikafeoylchinových kyselin [17,18]. .....	21
Obrázek 5 Strukturní vzorec rutinu [20]. .....	22
Obrázek 6 Schéma HPLC systému [23]. .....	24
Obrázek 7 Příklady chromatogramů při ultrazvukové lázni 30 min. ....	38
Obrázek 8 Příklady chromatogramů při ultrazvukové lázni 30 min. ....	39
Obrázek 9 Chromatogram směsného roztoku standardů .....	41
Obrázek 10 Příklad záznamu stanovení TAA u vzorku listí odrůdy 'Clapova' .....	43
Obrázek 11 Porovnání nastříkovaných objemů (5 µl a 10 µl) u plodů odrůdy 'Clapova' .....	43
Obrázek 12 Porovnání ředěného a neředěného vzorku plodů odrůdy 'Clapova' .....	44
Obrázek 13 Příklad špatného odběru kůry ('Clapova') v období srpen – září v porovnání s odběrem říjen – listopad .....	55
Obrázek 14 Chromatogramy vzorku listů odrůdy 'Clapova' v období březen – duben 2020 .....	56
Obrázek 15 Chromatogramy vzorku kůry odrůdy 'Clapova' v období březen – duben 2020 .....	57
Obrázek 16 Chromatogramy vzorku pupenů odrůdy 'Clapova' v období březen – duben 2020 .....	57
Obrázek 17 Chromatogramy vzorku plodů odrůdy 'Clapova' v období srpen – září 2019 .....	58

Obrázek 18 Chromatogramy vzorku květů odrůdy 'Clapova' v období březen – duben 2020 .....	58
---	----

## 10. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 'Clapova' - obsah fenolických látek v mg/g .....	45
Graf 2 'Konference' - obsah fenolických látek v mg/g .....	46
Graf 3 'Williamsova červená' - obsah fenolických látek v mg/g .....	47
Graf 4 'Williamsova' - obsah fenolických látek v mg/g .....	48
Graf 5 'Charneuská' - obsah fenolických látek v mg/g .....	49
Graf 6 'Lucasova' - obsah fenolických látek v mg/g .....	50
Graf 7 'Higland' - obsah fenolických látek v mg/g.....	51
Graf 8 'Grosdemange' - obsah fenolických látek v mg/g .....	52
Graf 9 'Thirriotova' - obsah fenolických látek v mg/g .....	53
Graf 10 'General Leclerc' - obsah fenolických látek v mg/g.....	54
Graf 11 Celková antioxidační aktivita v $\mu\text{C}$ .....	60
Graf 12 Porovnání celkového množství fenolických látek v mg/g a TAA v $\mu\text{C}$ v období srpen – září.....	61
Graf 13 Porovnání celkového množství fenolických látek v mg/g a TAA v $\mu\text{C}$ v období říjen – listopad .....	61
Graf 14 Porovnání celkového množství fenolických látek v mg/g a TAA v $\mu\text{C}$ v období březen – duben .....	62

## 11. POUŽITÁ LITERATURA

1. KORBAN, Schuyler S., ed. The Pear Genome [online]. Cham: Springer International Publishing, 2019 [cit. 2020-02-20]. Compendium of Plant Genomes. DOI: 10.1007/978-3-030-11048-2. ISBN 978-3-030-11047-5.
2. NEČAS, Tomáš. Pěstujeme hrušně a kdouloně. Praha: Grada, 2010. Česká zahrada. ISBN 978-80-247-2500-0.
3. BALASUNDRAM, Nagendran, Kalyana SUNDRAM a Samir SAMMAN. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food Chemistry [online]. 2006, 99(1), 191-203 [cit. 2020-03-21]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.07.042. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814605006242>
4. LIAUDANSKAS, Mindaugas, Kristina ZYMONĖ, Jonas VIŠKELIS, Almantas KLEVINSKAS a Valdimaras JANULIS. Determination of the Phenolic Composition and Antioxidant Activity of Pear Extracts. Journal of Chemistry [online]. 2017, 2017, 1-9 [cit. 2020-04-13]. DOI: 10.1155/2017/7856521. ISSN 2090-9063. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/jchem/2017/7856521/>
5. BRAHEM, Marwa, Catherine M.G.C. RENARD, Severin EDER, Michèle LOONIS, Rim OUNI, Messaoud MARS a Carine LE BOURVELLEC. Characterization and quantification of fruit phenolic compounds of European and Tunisian pear cultivars. Food Research International [online]. 2017, 95, 125-133 [cit. 2020-04-14]. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.03.002. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096399691730090X>
6. ANDREOTTI, Carlo, Guglielmo COSTA a Dieter TREUTTER. Composition of phenolic compounds in pear leaves as affected by genetics, ontogenesis and the environment. Scientia Horticulturae [online]. 2006, 109(2), 130-137 [cit. 2020-04-14]. DOI: 10.1016/j.scienta.2006.03.014. ISSN 03044238. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304423806001464>

7. COLARIC, Mateja, Franci STAMPAR a Metka HUDINA. Bending affects phenolic content of William pear leaves. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Plant Soil Science* [online]. 2007, 57(2), 187-192 [cit. 2020-04-21]. DOI: 10.1080/09064710600834350. ISSN 0906-4710. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09064710600834350>
8. Arbutin Analysis in Leaves, Fruit and Branches of *Pyrus Anatolica*, Method Optimization. *Eurasian Journal of Analytical Chemistry* [online]. 2016, 01 March 2016, 11(5), 233-244 [cit. 2020-04-21]. DOI: 10.12973/ejac.2016.135a. ISSN 1306-3057.
9. ZHAI, Rui, Xiao-Ting LIU, Wen-Ting FENG, et al. Different Biosynthesis Patterns among Flavonoid 3-glycosides with Distinct Effects on Accumulation of Other Flavonoid Metabolites in Pears (*Pyrus bretschneideri* Rehd.). *PLoS ONE*. 2014, 9(3). DOI: 10.1371/journal.pone.0091945. ISSN 1932-6203. Dostupné také z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0091945>
10. ÖZTÜRK, Ahmet, Leyla DEMIRSOY, Hüsnü DEMIRSOY, Adem ASAN a Osman GÜL. Phenolic Compounds and Chemical Characteristics of Pears (*Pyrus Communis* L.). *International Journal of Food Properties* [online]. 2014, 18(3), 536-546 [cit. 2020-02-25]. DOI: 10.1080/10942912.2013.835821. ISSN 1094-2912. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10942912.2013.835821>
11. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Arbutin, CID=440936, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Arbutin> (accessed on Mar. 21, 2020)
12. DU, Guan-Hua. *Natural Small Molecule Drugs from Plants* [online]. Singapore: Springer Singapore, 2018 [cit. 2020-02-26]. DOI: 10.1007/978-981-10-8022-7. ISBN 978-981-10-8021-0.
13. WILLEMS, Jamie L. a Nicholas H. LOW. Structural identification of compounds for use in the detection of juice-to-juice debasing between apple and pear juices. *Food Chemistry* [online]. 2018, 241, 346-352 [cit. 2020-04-19]. DOI:



- 10.1016/j.foodchem.2017.08.104. ISSN 03088146. Dostupné z:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814617314395>
14. MIGAS, Piotr a Mirosława KRAUZE-BARANOWSKA. The significance of arbutin and its derivatives in therapy and cosmetics. *Phytochemistry Letters* [online]. 2015, 13, 35-40 [cit. 2020-04-19]. DOI: 10.1016/j.phytol.2015.05.015. ISSN 18743900. Dostupné z:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874390015001123>
15. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Chlorogenic acid, CID=1794427, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chlorogenic-acid> (accessed on Mar. 23, 2020)
16. FARAH, Adriana, Mariana MONTEIRO, Carmen M. DONANGELO a Sophie LAFAY. Chlorogenic Acids from Green Coffee Extract are Highly Bioavailable in Humans. *The Journal of Nutrition* [online]. 2008, 138(12), 2309-2315 [cit. 2020-03-24]. DOI: 10.3945/jn.108.095554. ISSN 0022-3166. Dostupné z:  
<https://academic.oup.com/jn/article/138/12/2309/4670148>
17. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. 1,5-Dicaffeoylquinic acid, CID=122685, [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1\\_5-Dicaffeoylquinic-acid](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1_5-Dicaffeoylquinic-acid) (accessed on Mar. 25, 2020)
18. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. 3,5-Dicaffeoylquinic acid, CID=6474310, [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3\\_5-Dicaffeoylquinic-acid](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3_5-Dicaffeoylquinic-acid) (accessed on Mar. 25, 2020)
19. SOTO-HERNANDEZ, Marcos, Mariana PALMA-TENANGO a Maria del Rosario GARCIA-MATEOS, ed. *Phenolic Compounds - Biological Activity* [online]. InTech, 2017 [cit. 2020-03-24]. DOI: 10.5772/63693. ISBN 978-953-51-2959-2.

20. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Rutin, CID=5280805, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Rutin> (accessed on Mar. 25, 2020)
21. PEDRIALI, Carla Aparecida, Adjaci Uchoa FERNANDES, Leandra de Cássia BERNUSSO a Bronislaw POLAKIEWICZ. The synthesis of a water-soluble derivative of rutin as an antiradical agent. *Química Nova* [online]. 2008, 31(8), 2147-2151 [cit. 2020-03-25]. DOI: 10.1590/S0100-40422008000800039. ISSN 0100-4042. Dostupné z: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422008000800039&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422008000800039&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)
22. PATEL, Kanika a Dinesh Kumar PATEL. The Beneficial Role of Rutin, A Naturally Occurring Flavonoid in Health Promotion and Disease Prevention: A Systematic Review and Update. *Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases* [online]. Elsevier, 2019, 2019, s. 457-479 [cit. 2020-03-25]. DOI: 10.1016/B978-0-12-813820-5.00026-X. ISBN 9780128138205. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012813820500026X>
23. VERMA, Surendra P. a Edgar SANTOYO. High-Performance Liquid and Ion Chromatography: Separation and Quantification Analytical Techniques for Rare Earth Elements. *Geostandards and Geoanalytical Research* [online]. 2007, 31(3), 161-184 [cit. 2020-03-28]. DOI: 10.1111/j.1751-908X.2007.00842.x. ISSN 0150-5505. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1751-908X.2007.00842.x>
24. Ascentis® Express RP-Amide Column Care & Use Sheet. Merck [online]. 2008 [cit. 2020-03-31]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/Datasheet/1/T708015.pdf>

25. Ascentis® Express HPLC Resource Guide [online]. In: . s. 1-32 [cit. 2020-04-12].  
Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/Brochure/1/t409118.pdf>
26. GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, Rosa M., Lina BARRAGÁN-MENDOZA, Ana L. PERAZA-CAMPOS, Roberto MUÑIZ-VALENCIA, Silvia G. CEBALLOS-MAGAÑA a Hortensia PARRA-DELGADO. Validation of an HPLC-DAD method for the determination of plant phenolics. *Revista Brasileira de Farmacognosia* [online]. 2019, 29(5), 689-693 [cit. 2020-04-20]. DOI: 10.1016/j.bjp.2019.06.002. ISSN 0102695X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0102695X19303710>
27. MATTONAI, Marco, Erica PARRI, Diletta QUERCI, Ilaria DEGANO a Erika RIBECHINI. Development and validation of an HPLC-DAD and HPLC/ESI-MS2 method for the determination of polyphenols in monofloral honeys from Tuscany (Italy). *Microchemical Journal* [online]. 2016, 126, 220-229 [cit. 2020-04-20]. DOI: 10.1016/j.microc.2015.12.013. ISSN 0026265X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026265X15003574>
28. ŠKEŘÍKOVÁ, Veronika, Lucie GRYNOVÁ, Pavel JANDERA. Využití coulometrického detektoru coularray pro analýzu přírodních antioxidantů. *Chemické Listy* 98. 2004, 343–348.
29. RŮŽIČKA, Jaromír a Elo Harald HANSEN. *Flow injection analysis*. 2nd ed. New York: J. Wiley, c1988. ISBN 0-471-81355-9.
30. SOCHOR, Jiri, Jiri DOBES, Olga KRYSTOFOVA, et al. Electrochemistry as a Tool for Studying Antioxidant Properties. *International Journal of Electrochemical Science*. 2013, (8), 8464 – 8489.
31. BLASCO, Antonio J., M.C. ROGERIO, M.C. GONZÁLEZ a A. ESCARPA. “Electrochemical Index” as a screening method to determine “total polyphenolics” in foods: A proposal. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2005, 539(1-2), 237-244 [cit. 2020-04-05]. DOI: 10.1016/j.aca.2005.02.056. ISSN 00032670. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267005003028>

32. PAULOVÁ, Hana, Hana BOCHOŘÁKOVÁ a Eva TÁBORSKÁ. METODY STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY PŘÍRODNÍCH LÁTEK IN VITRO. Chem. Listy 98. 2004, 174 – 179.
33. LEE, Ki Hoon, Jeong-Yong CHO, Hyoung Jae LEE, et al. Isolation and identification of phenolic compounds from an Asian pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) fruit peel. Food Science and Biotechnology [online]. 2011, 20(6), 1539-1545 [cit. 2020-04-14]. DOI: 10.1007/s10068-011-0213-4. ISSN 1226-7708. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10068-011-0213-4>
34. KOLNIAK-OSTEK, Joanna a Jan OSZMIAŃSKI. Characterization of phenolic compounds in different anatomical pear (*Pyrus communis* L.) parts by ultra-performance liquid chromatography photodiode detector-quadrupole/time of flight-mass spectrometry (UPLC-PDA-Q/TOF-MS). International Journal of Mass Spectrometry [online]. 2015, 392, 154-163 [cit. 2020-04-14]. DOI: 10.1016/j.ijms.2015.10.004. ISSN 13873806. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1387380615003437>
35. LIN, Long-Ze a James M. HARNLY. Phenolic Compounds and Chromatographic Profiles of Pear Skins (*Pyrus* spp.). Journal of Agricultural and Food Chemistry [online]. 2008, 56(19), 9094-9101 [cit. 2020-04-14]. DOI: 10.1021/jf8013487. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf8013487>
36. SASAKI, Chizuru, Masaki ICHITANI, Ko-Ki KUNIMOTO, Chikako ASADA, Yoshitoshi NAKAMURA a X.Q. YE. Extraction of arbutin and its comparative content in branches, leaves, stems, and fruits of Japanese pear *Pyrus pyrifolia* cv. Kousui. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry [online]. 2014, 78(5), 874-877 [cit. 2020-05-01]. DOI: 10.1080/09168451.2014.893185. ISSN 0916-8451. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09168451.2014.893185>
37. XU, G.H., J.C. CHEN, D.H. LIU, Y.H. ZHANG, P. JIANG a X.Q. YE. Minerals, Phenolic Compounds, and Antioxidant Capacity of Citrus Peel Extract by Hot Water. Journal of Food Science [online]. 2008, 73(1), C11-C18 [cit. 2020-05-01].

DOI: 10.1111/j.1750-3841.2007.00546.x. ISSN 00221147. Dostupné z:  
<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3841.2007.00546.x>