

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE



**VYUŽITÍ HPLC TECHNIKY V ANALÝZE FENOLICKÝCH LÁTEK V ROSTLINNÉM
MATERIÁLU OVOCNÝCH STROMŮ**

DISERTAČNÍ PRÁCE

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

Poděkování

Velké poděkování bych ráda věnovala svému školiteli Prof. RNDr. Daliborovi Šatínskému, Ph.D., který mě již od diplomové práce provázel celým doktorským studiem. Vždy mi poskytoval odborné rady a profesní oporu v řešení problému a při plánování experimentů. Děkuji mu za lidský přístup, loajalitu a vytvoření pozitivní atmosféry na pracovišti.

Děkuji svým školitelům na vědecké stáži, kteří mi vytvořili příjemné pracovní prostředí během působení na jejich pracovištích. Kristian Holst Laursen a Nicolai Zederkopff Ballin mi s velkou ochotou předávali své odborné zkušenosti, zajistili bezproblémový pobyt v Dánsku a vytvořili mi tak příjemně a nezapomenutelně strávený čas v zahraničí.

Mé poděkování patří konzultantovi Doc. Ing. Aleši Hornovi, CSc. za volbu zajímavého tématu disertační práce. Dále samozřejmě mé rodině, přátelům a známým, kteří mě během studia podporovali.

Práce vznikla za finanční podpory Specifického vysokoškolského výzkumu 260 548, Grantové agentury Univerzity Karlovy č. 1152120, Technologické agentury České republiky č. TJ02000196. Tímto děkuji za možnost prezentovat výsledky svého výzkumu na konferencích.

Prohlášení o původnosti

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

V Hradci Králové dne

Anežka Adamcová

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Mgr. Anežka Adamcová

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

Název disertační práce: Využití HPLC techniky v analýze fenolických látek v rostlinném materiálu ovocných stromů

Ačkoliv jsou ovocné plody již detailně prozkoumány a známy pro svůj vysoký obsah antioxidantů a pozitivní zdravotní účinky, nosné téma této předložené disertační práce spočívá v charakterizaci obsahu biologicky aktivních látek v jednotlivých částech ovocných stromů (listí, kůra, pupeny, květy, a odpadní produkt štěpka).

Teoretická část pojednává o ovocných stromech a problematice fenolických látek. Na základě vědeckých studií jsou uvedeny jejich vlastnosti a účinky na organismus. Další část rozebírá chromatografické metody pro separaci fenolických látek včetně uvedení moderních trendů. Není opomíjena extrakce těchto látek z rostlinného materiálu.

Praktická část se věnuje validaci a vývoji screeningových HPLC metod s DAD detekcí pro analýzu sledovaných fenolických látek (floridzin, floretin, kyselina chlorogenová, kvercitrin, rutin, arbutin, kyselina 1,5-dikafeoylchinová a kyselina 3,5-dikafeoylchinová) v jednotlivých částech ovocných stromů. Předmětem zájmu je zaznamenat měnící se fenolický profil v rámci vegetačního období. Je uvedena extrakce studovaných látek s cílem najít optimální podmínky pro co největší výtěžnost, která byla kritickým bodem extrakce. Navíc, u hrušňového listí byla vyzkoušena horká voda jako extrakční činidlo a u vodných extraktů byla rovněž prokázána antimikrobiální aktivita.

Pro analýzy byly použity kolony YMC Triart C18 ExRS (150 × 4,6 mm, velikost částic 5 μm) (materiál z jabloně) a Ascentis Express RP amid (150 × 4,6, velikost částic 2,7 μm) (materiál z hrušně). Bylo zkoumáno 10 odrůd jabloní, 10 odrůd hrušní a odběr byl proveden v období březen-duben, červen, srpen-září a listopad. Hlavní fenolickou látkou byl u jabloní zjištěn floridzin, a u materiálu z hrušní arbutin a kyselina chlorogenová. Z hlediska výskytu a nejvyššího obsahu fenolických látek je nejdůležitější listí v jarním období. Ze zkoumaných odrůd byly obsahově nejbohatší 'Rubinstep' (jabloň) a 'Konference' (hrušeň).

Výsledky práce nabízí možnost uplatnění všudypřítomného zemědělského a defacto odpadního materiálu k vývoji originálních produktů ve farmaceutickém, potravinářském či kosmetickém průmyslu. Prostým důvodem je enormní množství fenolických látek, jejichž koncentrace je v sušině těchto materiálů mnohonásobně vyšší než v plodech.

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Mgr. Anežka Adamcová

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

Title of the Dissertation Thesis:

The use of HPLC technique in the analysis of phenolic compounds in plant material of fruit trees

Although fruits are well studied and known for their high content of antioxidants and positive health benefits, the main aim of the presented dissertation thesis consists in the characterization of biological active compounds in individual parts of fruit tree material (leaves, bark, buds, flowers, and wood chips).

The theoretical part is focused on fruit trees and the characterization of phenolic compounds. Their properties and the effects based on current scientific studies are shown. A large part of thesis is dealing with the chromatographic methods for the separation of phenolic substances including the current trends. The extraction process is also included.

The practical part deals with the validation and development of screening HPLC-DAD method for the analysis of monitored phenolic compounds (phloridzin, phloretin, chlorogenic acid, quercitrin, rutin, arbutin, 1,5-dicafeoylquinic acid, and 3,5-dicafeoylquinic acid) in individual parts of fruit trees. The main objective of this thesis is to determine changing phenolic profile within the vegetation period. Extraction process of the monitored substances is presented in order to find the optimal conditions for the highest recovery that was the critical point. Moreover, hot water as a solvent was used to extract pear leave and antimicrobial activity of these extracts was determined.

A YMC Triart C18 ExRS (150 × 4.6 mm, particle size 5 μm) (apple tree material) and Ascentis Express RP amide (150 × 4.6 mm, particle size 2.7 μm) (pear tree material) were used for analysis. Ten apple and pear tree cultivars were harvested in period of March-April, June, August-September, and November. The major phenolic compounds were definitely phloridzin in apple trees, and arbutin and chlorogenic acid in pear trees. In terms of the occurrence of phenolic compounds, the most important is the leaves in spring season. The richest cultivars were 'Rubinstep' (apple tree) and 'Konference' (pear tree).

The results of this thesis offer the possibility of using abundant and unused agricultural waste material for the development of original products in the pharmaceutical, food, and cosmetic industry. The reason is the enormous amounts of phenolic compounds that concentration is significantly higher than in fruits.

Obsah

1. Úvod	14
2. Cíl práce.....	15
3. Teoretická část	16
3.1. Ovocné stromy	16
3.2. Choroby a škůdci ovocných stromů	16
3.3. Obsahové látky v listech a srovnání s plody	17
3.4. Biosyntéza fenolických látek	21
3.5. Stanovované fenolické látky	22
3.5.1. Floridzin	22
3.5.1.1. Výskyt floridzinu	22
3.5.1.2. Floridzin - hyperglykémie, diabetes mellitus	23
3.5.1.3. Studie s pacienty	24
3.5.1.4. <i>In vivo</i> studie na laboratorních zvířatech	25
3.5.2. Arbutin.....	27
3.5.3. Rutin	28
3.5.4. Kyselina chlorogenová.....	28
3.5.5. Kvercitrin	29
3.5.6. Floretin	30
3.6. Fyzikálně-chemické vlastnosti stanovených fenolických látek	31
3.7. Stanovení fenolických látek v rostlinném materiálu	32
3.7.1. Kapalinové chromatografie	32
3.7.2. Trendy ve stacionárních fázích.....	33
3.7.3. Moderní směry systému HPLC	34
3.7.4. Detekce fenolických látek v kapalinové chromatografii	35
3.7.5. Přehled studií zabývajících se stanovením fenolických látek v ovocných stromech	37
3.8. Validace analytických metod	38
3.9. Příprava rostlinného materiálu pro analýzu	39
4. Experimentální část.....	42
4.1. Analyzované vzorky.....	42
4.2. Chemikálie a činidla	42
4.3. Příprava vzorku	43

4.3.1. Antimikrobiální aktivita hrušňového listí	44
4.4. HPLC metoda stanovení fenolických látek z jabloně	45
4.4.1. Přístroje a podmínky separace	45
4.4.2. Příprava směsného roztoku standardů pro vývoj metody.....	45
4.4.3. Validace metody.....	46
4.5. HPLC metoda pro stanovení fenolických látek z hrušně.....	47
4.5.1. Přístroje a podmínky separace	47
4.5.2. Příprava směsného roztoku standardů pro vývoj metody.....	47
4.5.3. Validace metody.....	48
4.6. Stanovení obsahu fenolických látek.....	48
5. Výsledky.....	50
5.1. Optimalizace chromatografické metody a volba kolony pro analýzu materiálu z jabloně ..	50
5.2. Optimalizace extrakčního postupu – jabloň	52
5.3. Validační parametry HPLC metody pro analýzu materiálu z jabloní	53
5.3.1. Test vhodnosti chromatografického systému	53
5.3.2. Validační parametry - jabloň	54
5.4. Sledování fenolického profilu v průběhu vegetace – jabloň	54
5.4.1. Odrůda 'Topaz'	55
5.4.2. Odrůda 'Golden Delicious'	56
5.4.3. Odrůda 'Angold'	57
5.4.4. Odrůda 'Meteor'	58
5.4.5. Odrůda 'Melrose'	59
5.4.6. Odrůda 'Fuji'	60
5.4.7. Odrůda 'Braeburn'	61
5.4.8. Odrůda 'Lady Silvia'	62
5.4.9. Odrůda 'Rubinstep'	63
5.4.10. Odrůda 'Rubin'	64
5.4.11. Štěpka jabloní.....	65
5.4.12. Souhrn výsledků – jabloň	65
5.5. Vývoj chromatografické metody a extrakce pro analýzu materiálů z hrušně	67
5.6. Validační parametry HPLC metody pro analýzu materiálu z hrušně	69
5.6.1. Test vhodnosti chromatografického systému	69
5.6.2. Validační parametry - hrušně.....	69

5.7. Sledování fenolického profilu v průběhu vegetace – hrušeň	70
5.7.1. Odrůda 'Clapova'	70
5.7.2. Odrůda 'Konference'	71
5.7.3. Odrůda 'Williamsova červená'	72
5.7.4. Odrůda 'Williamsova'	73
5.7.5. Odrůda 'Charneuská'	74
5.7.6. Odrůda 'Lucasova'	75
5.7.7. Odrůda 'Highland'	76
5.7.8. Odrůda 'Grosdemange'	77
5.7.9. Odrůda 'Thirriotova'	78
5.7.10. Odrůda 'General Leclerc'	79
5.7.12. Extrakce horkou vodou	80
5.7.12.1. Celkový obsah fenolických látek v horké vodě a metanolových extraktech	82
5.7.12.2. Antimikrobiální aktivita vodných extraktů hrušňového listí	82
5.7.13. Souhrn výsledků – hrušeň	84
6. Závěr a budoucí perspektiva	86
7. Seznam obrázků	89
8. Seznam tabulek	90
9. Seznam grafů	92
10. Seznam použité literatury	94
11. Seznam publikací, abstraktů a řešených projektů	102
11.1. Přehled publikovaných prací v impaktovaných časopisech	102
11.2. Přehled certifikovaných metodik	103
11.3. Přehled ústních prezentací	103
11.4. Přehled plakátových sdělení prezentovaných na domácích a mezinárodních konferencích	104
11.5. Přehled řešených projektů	104
12. Přílohy	105
11.1. Chromatogramy směsi standardů na testovaných kolonách při vlnové délce 254 nm	105
11.1.1. YMC Triart C18 (100 × 4,6 mm, velikost částic 5 μm)	105
11.1.2. YMC Triart PFP plus (150 × 4,6 mm, velikost částic 5 μm)	105
11.1.3. Discovery® HS C18 (150 × 4,6 mm, velikost částic 5 μm)	106
11.1.4. Kinetex® F5 100A (150 × 4,6 mm, velikost částic 2,6 μm)	106

11.1.5. Kinetex® C18 100A (150 × 4,6 mm, velikost částic 2,6 μm)	107
11.1.6. Luna Omega Polar C18 (150 × 4,6 mm, velikost částic 5 μm)	107
11.1.7. Kinetex 100A Biphenyl (150 × 4,6 mm, velikost částic 5 μm)	108
11.1.8. Ascentis Express RP amide (150 × 4,6 mm, velikost částic 2,7 μm).....	108
11.2. Parametry testovaných kolon – jabloň	109
11.3. Parametry testované kolony – hrušeň	111

POUŽITÉ ZKRATKY

2D-LC	dvourozměrná chromatografie
AK	aminokyselina
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
CoA	koenzym A
CO ₂	oxid uhličitý
ČSÚ	Český statistický úřad
CHS	chalkon syntáza
DM	diabetes mellitus
DAD	detektor diodového pole
DCQA	dikafeylchinová kyselina
DW	suchá hmota
EMA	Evropská léková agentura
ESI	ionizace elektrosprejem
FDA	Agentura pro kontrolu léčiv a potravin
FW	čerstvá hmotnost
G6P	glukóza-6-fosfát
GLUT	glukózový transportér
HFD	vysokotučná dieta
HIV	lidský virus imunitní nedostatečnosti
ICH	mezinárodní rada pro harmonizaci
IUPAC	mezinárodní unie pro čistou a aplikovanou chemii
MASE	extrakce podporována mikrovlnným ohřevem
MF	mobilní fáze
MMIPs	magnetické molekulárně vtištěné polymery
MS	hmotnostní spektrometrie
MTX	methotrexát
ND	normální dieta

OGTT	orální glukózový toleranční test
PTFE	polytetrafluoretylen
RP	reverzní fáze
RSD	relativní směrodatná odchylka
SF	stacionární fáze
SFC	superkritická fluidní chromatografie
SGLT	sodíkovo-glukózový transportér
SIM	selektivní záznam iontů
SRM	monitorování vybraných reakcí
SST	test vhodnosti systému
TNBC	triple-negativní karcinom prsu
UAE	extrakce ultrazvukem
UHPLC	ultravysokoučinná kapalinová chromatografie
UV	ultrafialové záření
VIS	viditelné záření

1. ÚVOD

Rostliny a látky v nich obsažené představují četný zdroj biologicky aktivních látek s rozmanitými vlastnosti, zahrnující škálu příznivých i negativních účinků pro všechny živé organismy. Mezi často vyhledávané pojmy u odborné vědecké společnosti i široké veřejnosti patří fenolické látky. Jedná se o sekundární metabolity rostlin, které zahrnují více jak 8 000 látek s různorodým chemickým složením. Lze je nalézt v rostlinách a běžně konzumovaných potravinách (kakao, čaj, ovoce, zelenina, víno), kterým propůjčují barvu a sensorické vlastnosti. Jejich pravidelná konzumace je spojována se spoustou pozitivních účinků podloženými vědeckými studiemi.

Ovocné stromy, jabloně a hrušně, patří mezi oblíbeně pěstované dřeviny u malospotřebitelů ovoce a zahrádkářů. Složení ovocných plodů se zdá být důkladně prozkoumáno. Bohužel ne stejné publicitě se těší práce, zabývající se výzkumem částmi stromů jako jsou listí, kůra, pupeny, květy nebo štěpka.

Biomasa ovocných stromů obsahuje vysoké množství fenolických látek a jiných antioxidantů, které jsou v sušině řádově vyšší než obsah těchto látek v ovoci. Tento doposud nevyužívaný a hojně se vyskytující zemědělský materiál by tak mohl být recyklován. Nepoužitím (vyhozením, kompostováním či škodlivým spalováním) se připravujeme o zdroj cenných bioaktivních látek s potenciálním uplatněním ve farmaceutickém, potravinářském, nebo kosmetickém průmyslu. Stále přibývá zájem o přírodní produkty s vysokým obsahem zdraví prospěšných látek a rostlinné části ovocných stromů a jejich zpracování například do formy doplňků stravy můžou tuto poptávku naplnit.

Konvenční přístup k analytickému stanovení fenolických látek v rostlinných matricích zahrnuje metodu vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), která umožňuje separaci a následnou kvantifikaci. Stále častěji se začíná prosazovat ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC) a populární se stává také superkritická fluidní chromatografie (SFC). Rovněž se neustále vyvíjejí nové modifikace stacionárních fází. Vzhledem k tomu, že fenolické látky obsahují chromoforové jádro, k jejich detekci je často využívána spektrofotometrická detekce, nejčastěji detektor diodového pole (DAD). Pre-analytickou část tvoří extrakce fenolických látek, ke které lze využít extrakci kapalinou pomocí ultrazvuku, maceraci, moderní superkritickou fluidní extrakci (SFE) a mnoho dalších pokročilých extrakčních technik.

2. CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části disertační práce je shrnutí základních informací o studovaných ovocných stromech, jabloních a hrušních. Prvním úkolem je charakteristika hlavních analyzovaných fenolických látek a popis jejich biosyntézy, chemických a biologických vlastností s využitím nejnovějších vědeckých studií. Hlavní pozornost je věnována floridzinu. Dalším cílem je popis možností stanovení fenolických látek v rostlinné matrici s využitím HPLC metody včetně uvedení moderních trendů v separačních metodách. Posledním a neméně důležitým úkolem je seznámit čtenáře se základními validačními pojmy a problematikou přípravy a úpravy vzorku na bázi rostlinného materiálu.

Cílem praktické části je vyvinutí a následná validace HPLC metod pro separaci a kvantifikaci fenolických látek v extraktech listí, kůry, pupenů, květů, a štěpky za použití moderních stacionárních fází. Úkolem je optimalizace extrakčního postupu při zpracování rostlinného materiálu ovocných stromů a vyzkoušet různé typy rozpouštědel (metanol, horká voda). Záměrem praktické části je aplikace metod na velké množství odrůd a sledovat měnící se fenolický profil dostupného materiálu v průběhu vegetačního období. Finálním požadavkem je určit typ rostlinného materiálu, odrůdu a období s nejvyšším množstvím fenolických látek v jabloních a hrušních.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Ovocné stromy

Studované ovocné stromy, jabloň a hrušeň, patří do říše *Plantae* (rostliny), oddělení *Magnoliophyta* (krytosemenné rostliny), třídy *Rosopsida* (vyšší dvouděložné rostliny), řádu *Rosales* (růžotvaré), čeledi *Rosaceae* (růžovité), podčeledi *Amygdaloideae*. Jabloň spadá do rodu *Malus* Mill. a hrušeň do rodu *Pyrus* L. [1].

Ve Státní odrůdové knize je evidováno více jak 30 druhů jabloní a v současné době se v České republice u jabloně domácí (*Malus domestica* Borkh.) pěstuje až 250 odrůd. U hrušní existuje více jak 20 druhů a u hrušně obecné (*Pyrus communis* L.) je zapsáno více jak 115 odrůd. Jednotlivé odrůdy jabloní i hrušní lze rozdělit podle zralosti na letní, podzimní a zimní [2,3].

Z posledního šetření Českého statistického úřadu (ČSÚ) z roku 2017, které zahrnovalo 1 755 pěstitelů ovoce, je celková výměra ovocných ploch 15 473 ha. V České republice nejvíce rozšířené ovocné stromy z čeledi růžovitých jsou jabloně pěstované na celkové ploše 7 819 ha (47,6 %) s průměrnou hustotou 1 322 jabloní na hektar. Výměra hrušňových sadů představuje 8 870 ha (5,3 %) [4].

3.2. Choroby a škůdci ovocných stromů

Virová onemocnění. Mezi tyto choroby patří například chlorotická skvrnitost listů jabloně, žlábkovitost a vrásčitost kmene jabloně, kaménkovitost. Napadené stromy rostou pomaleji než zdravé. Většina komerčních odrůd jabloní a hrušní jsou však tolerantní vůči virům [5].

Bakteriální onemocnění. Nejzávažnějším onemocněním nejen jabloní a hrušní je bakteriální spála růžovitých. Původcem je *Erwinia amylovora* (Burrill). Jedná se o rychle se šířící onemocnění, které napadá všechny části stromu. Listy, květy a plody hnědnou nebo černají a postupně usychají. Kůra je zpočátku nasáklá vodou, ale později se scvrkává a hnědne. Za vlhkého a teplého počasí z napadených částí vytéká bakteriální sliz, který je zdrojem dalšího šíření onemocnění. Při silné infekci může strom uhynout již během jedné sezóny [5].

Houbové onemocnění. Původcem padlí jabloní je *Podosphaera leucotricha*. Poškození se projevuje bělavými povlaky na listech, květech, letorostech a plodech. Silně napadené části hnědnou a zasychají. Na plodech vzniká mramorovitá korkovitost (rzivost). Významnou

chorobou je strupovitost a je způsobena *Venturia pirina* (hrušeň) a *Verturia inaequalis* (Strupatka jabloňová) (jabloň). Choroba napadá větvičky, listy, květy, plody a pupeny. Na listech se objevují hnědočerné skvrny. Infekce větvíček zapříčiňuje otoky, které praskají a plody jsou deformované. Mezi další onemocnění patří například nektriová korová nektróza [5].

Škůdci. Mezi škůdce ovocných stromů patří moli (Obaleč jablečný), mšice (Vlnatka krvavá), roztoči (Sviluška ovocná) [5].

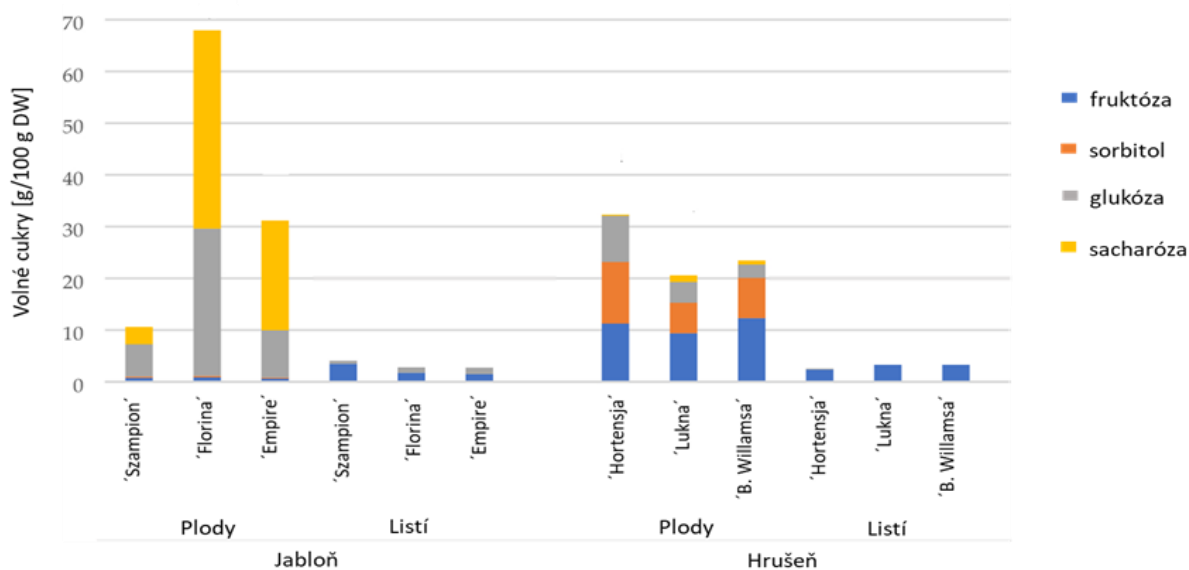
Fenolické látky hrají důležitou roli v obranných mechanismech rostlin a v případě poškození ovocných stromů dochází ke změnám v obsahu fenolických látek. Napadením patogenem způsobující strupovitost došlo k akumulaci fenolických látek v infikovaných jablečných listech. Došlo ke zvýšení flavanolů, kyseliny chlorogenové a také celkového množství fenolických látek zjištěných Folin-Ciocalteuovou metodou [6]. Zvýšená koncentrace fenolických látek (až 1,5krát) byla sledována i v listech hrušní po infekci patogenem rzi hrušní. Došlo ke vzniku žlutých skvrn na listech a ty měly oproti zdravým, zeleným listům vyšší obsah flavanolů (katechiny a prokyanidiny) a arbutinu [7].

3.3. Obsahové látky v listech a srovnání s plody

Z hlediska možného praktického využití má listí velký potenciál, a proto je třeba uvést zastoupení obsahových (nejen fenolických) látek a jejich srovnáním s plody, které jsou širokou veřejností konzumovány pro své zdraví prospěšné vlastnosti.

Volné cukry. Z grafu 1 lze vidět, že listí jabloní a hrušní obsahuje daleko menší množství volných cukrů (fruktóza, sorbitol, glukóza, sacharóza) než příslušné plody. Koncentrace cukru v ovoci je 10,6 g/100 g suché hmotnosti (DW) – 68,0 g/100 g DW a v listech 1,3 g/100 g DW – 4,0 g/100 g DW. Sacharóza a glukóza (jabloň), fruktóza a sorbitol (hrušeň) jsou hlavními cukry v plodech, zatímco v listech obou stromů se nachází primárně fruktóza a pouze ve stopovém množství se vyskytuje i glukóza. Sorbitol je syntetizován v listech z glukóza-6-fosfátu enzymem sorbitol-6-fosfátdehydrogenázou a následně je translokován do plodů. Nepřítomnost tohoto cukru v listech znamená, že biochemická konverze proběhla úplně. Druh plodu (jablko vs. hrušeň), část stromu (plody vs. listí) a odrůda má vliv na obsah volných cukrů [8].

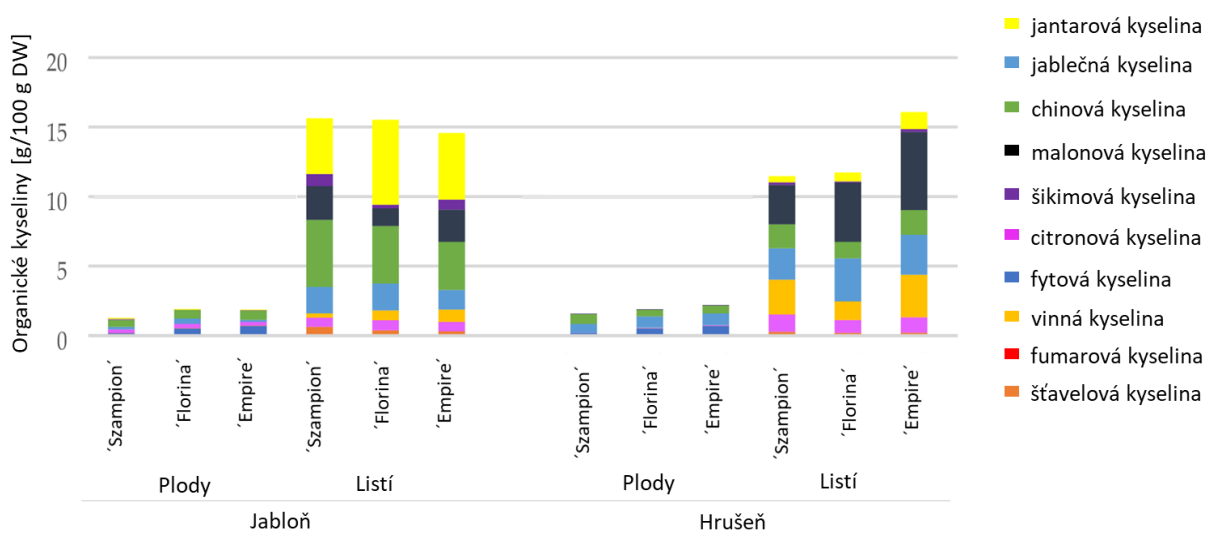
Graf 1: Zastoupení jednotlivých cukrů v plodech a listích ovocných stromů.



Převzato a upraveno ze studie Wojdyła a kol. (2021) [8].

Organické kyseliny. Listí stanovených ovocných stromů naopak obsahuje vyšší množství organických kyselin (kyselina fytová, šťavelová, citronová, vinná, jablečná, chinová, malonová, šikimová, jantarová, fumarová). Jejich koncentrace je v ovoci 1,3 g/100 g DW – 2,4 g/100 g DW a v listech 11,5 g/100 g DW – 16,0 g/100 g DW. V ovoci jsou dominantní tyto kyseliny: jablečná > chinová a citronová, zatímco v listech to jsou kyselina chinová, jablečná a malonová. Jak je patrné z grafu 2, koncentrace a zastoupení látek je závislá na druhu a odrůdě ovoce [8].

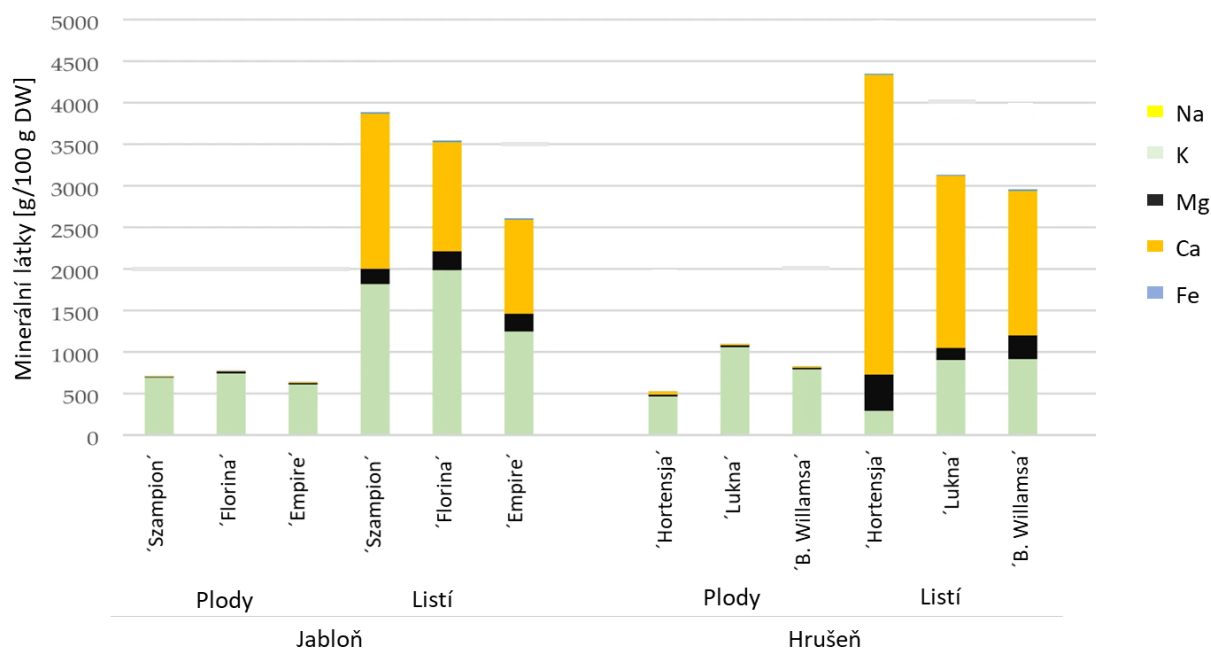
Graf 2: Zastoupení organických kyselin v ovocných stromech.



Převzato a upraveno ze studie Wojdyła a kol. (2021) [8].

Minerální látky. Listí je také významným zdrojem minerálních látek (graf 3). Jejich obsah je 3 – 6krát vyšší než v plodech. Dominantní jsou hlavně draslík, vápník a následně hořčík. Naopak hodnoty sodíku a železa jsou velmi nízké. Obsahy minerálních látek jsou signifikantně rozdílné mezi částmi stromu (plody vs. listí) [8].

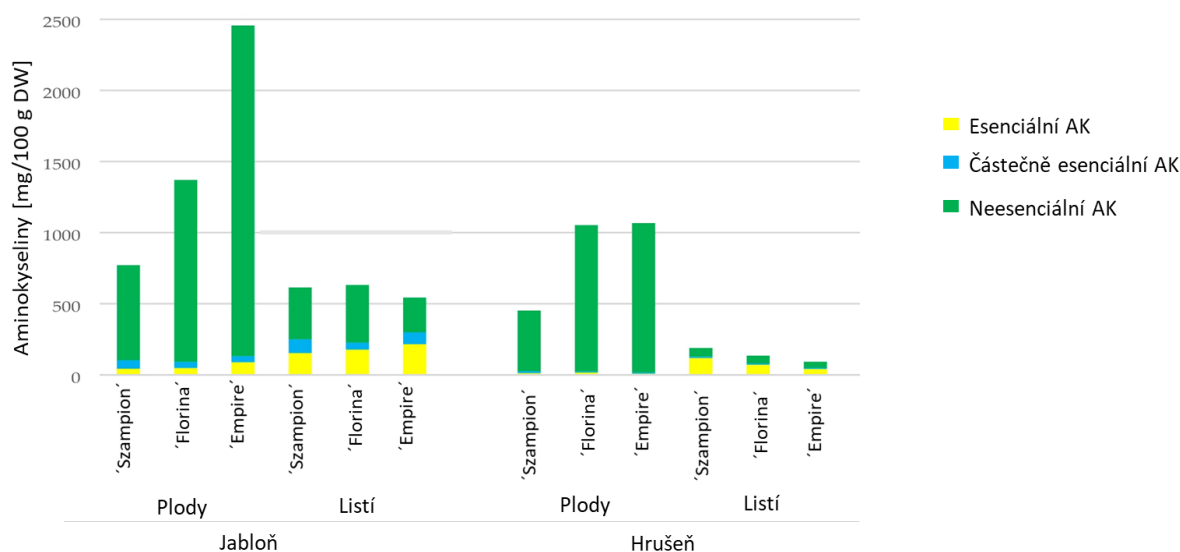
Graf 3: Zastoupení minerálních látek v ovocných stromech.



Převzato a upraveno ze studie Wojdyła a kol. (2021) [8].

Aminokyseliny. Celková koncentrace aminokyselin (esenciálních, částečně esenciálních, neesenciálních) je v listech jabloně i hrušně menší než v příslušných plodech (graf 4). Dominantní zastoupení tvoří neesenciální aminokyseliny (alanin, asparagin, asparagová kyselina, cystein, glutamová kyselina, serin, alanin). Významným zdrojem jsou jabloně (především plody), které na rozdíl od hrušně obsahují nezanedbatelné množství esenciálních (histidin, izoleucin, leucin, lysin, fenylalanin, threonin, tryptofan) a částečně esenciálních (arginin, glutamin, glycin, prolin, tyrosin) aminokyselin. Na druhou stranu, listí obsahuje rozmanitější složení aminokyselin a taky víc esenciálních aminokyselin než relevantní plody [8].

Graf 4: Zastoupení aminokyselin v ovocných stromech.



AK = aminokyselina

Převzato a upraveno ze studie Wojdyła a kol. (2021) [8].

Isoprenoidy. Koncentrace karotenoidů a chlorofylu v listí jabloňe (209,1 mg/100 g DW – 381,6 mg/100 g DW) a hrušně (294,2 mg/100 g DW – 583,9 mg/100 g DW) je mnohonásobně vyšší než v plodech jabloňe (5,6 mg/100 g DW – 12,6 mg/100 g DW) a hrušně (7,7 mg/100 g DW – 13,6 mg/100 g DW). Hladiny chlorofylu jsou vyšší než karotenoidy, zejména v listech. Obsah karotenoidů a chlorofylu je závislý na druhu, části stromu a odrůdě [8].

Triterpeny. Co se triterpenů týče, je dokázáno, že listí jabloňe a hrušně jsou stejným zdrojem triterpenů jako plody. Celková koncentrace triterpenů (tormentová, masklinová, pomolová, korosolová, betulinová, oleanolová, ursolová a α -boswelová kyselina, betulin, erythrodiol, uvaol) u plodů je 70,17 mg/100 g DW – 117,11 mg/100 g DW (jabloň) a 136,31 mg/100 g DW – 214,36 mg/100 g DW (hrušeň). V listech je celková koncentrace triterpenů 35,08 mg/100 g DW – 234,96 mg/100 g DW (jabloň) a 118,93 mg/100 g DW – 219,94 mg/100 g DW (hrušeň). Oleanolová, korosolová, ursolová kyselina a erythrodiol převládaly v plodech jabloňe. Kyselina ursolová a oleanolová byly charakteristické pro jabloňové listí. Pro plody a listí hrušně byl typický výskyt kyseliny korosolové, oleanolové a erythrodiolu [8].

Fenolické látky. Druh materiálu, plody vs. listí ovocných stromů, má významný vliv na obsah fenolických látek. Signifikantně vyšší koncentrace jsou nalezeny v listech ovocných stromů než v plodech. Odrůdy mají vliv na obsah fenolických látek kromě flavan-3-olů a fenolických kyselin. Bylo prokázáno, že vyšší obsah fenolických sloučenin byl identifikován

v listech rostlin rostoucích pod intenzivním slunečním zářením, což vede ke zvýšené genové expresi spojené s biosyntézou fenolických látek. V ovoci jsou dominantní prokyanidiny. V listech hrušní to jsou flavan-3-oly > > flavonoly > fenolické kyseliny a v listech jabloní dihydrochalkony > flavonoly ~ flavan-3-oly [8,9].

Například studie Stoenescu a kol. (2022) porovnávala obsah fenolických látek v plodech a listech různých typů ovoce. V *Malus sylvestris* byla zjištěna koncentrace 190,84 mg/100 g DW flavonoidů a 684 mg/100 g DW fenolických kyselin v plodech, zatímco v listí bylo nalezeno 617,45 mg/100 g DW flavonoidů a 2553,15 mg/100 g DW fenolických kyselin. *Pyrus pyraeaster* neobsahovala žádné stanovované flavonoidy v plodech, ale v listí byla jejich koncentrace 298,74 mg/100 g DW a fenolických kyselin bylo zjištěno 79,61 g/100 g DW v plodech a 914,56 g/100 g DW v listech [10].

3.4. Biosyntéza fenolických látek

Fenolické látky jsou syntetizovány šikimátovou metabolickou dráhou, která se uplatňuje hlavně v rostlinách. Dalším možným způsobem je malonová (polyacetátová) metabolická dráha, která je zdrojem vzniku fenolických látek v houbách a bakteriích. V některých případech se uplatňuje i směsná dráha [11].

Šikimátová dráha je běžným krokem vedoucí k produkci aromatických aminokyselin: fenylalaninu, tyrosinu a tryptofanu. Tato dráha se vyskytuje u rostlin, nikoliv však u živočichů [12]. Výchozími látkami jsou erytróza-4-fosfát a fosfoenolpyruvát. Jejich kondenzací, provázenou řadou dalších reakcí, vzniká důležitý meziprodukt: kyselina šikimová (neboli šikimát). Tento krok je blokován širokospektrálními herbicidy (glyfosátem, obchodní název: Roundup) [11].

Běžným prekurzorem rostlinných fenolických látek je aminokyselina fenylalanin, která je základní látkou u většiny cévnatých rostlin. Enzym fenylalanin-amoniak-lyáza (PAL) způsobí deaminaci aminokyseliny za vzniku kyseliny *trans*-skořicové. Biotické (napadení patogeny) a abiotické (mechanické poškození) stresory zvyšují aktivitu PAL [11].

Z kyseliny skořicové dalšími reakcemi (methoxylace, hydroxylace) vznikají fenolické kyseliny. První reakcí je navázání hydroxylové skupiny a vzniká kyselina *p*-kumarová (4-hydroxyskořicová kyselina) za účasti enzymu cinamát 4-hydroxyláza. Tato kyselina může dále

podléhat hydroxylaci v polohách 3 a 5 na aromatickém kruhu. Navázané hydroxylové skupiny můžou být metylovány působením O-metyltransferáz. Takto vznikají další fenolické kyseliny (například kyselina kávová, ferulová). Kyselina chlorogenová, která je často v práci zmiňována, je ester kyseliny chinové a kávové [11,13].

Při syntéze flavonoidů je důležitý enzym 4-kumarát-CoA ligáza, který mění kyselinu kumarovou na *p*-kumarylkoenzym A. Jeho kondenzací s třemi molekulami malonylkoenzymu A vzniká molekula chalkonu, což je zajišťováno enzymem chalkon-syntháza (CHS). Klíčovým enzymem je chalkon isomeráza, která přeměňuje chalkon na naringenin. Ten je progenitorem běžných flavonoidních struktur (například flavanoly, flavony, anthokyanidiny) za účasti dalších enzymů [11]. V této práci mnohokrát uváděné dihydrochalkony, vznikají působením dehydrogenázy (DH) na *p*-kumarylkoenzym A za vzniku *p*-dihydrokumarylu koenzymu A. Jeho kondenzací se třemi molekulami malonylkoenzymu A vzniká floretin, který je glykosylován za přítomnosti floretin-2'-O-glykosyltransferázy a vzniká floridzin [14].

3.5. Stanovované fenolické látky

Fenolické sloučeniny jsou přirozeně se vyskytující rostlinné sekundární metabolity. Z hlediska struktury obsahují nejméně jeden aromatický kruh s různým počtem hydroxylových skupin. Lze je rozdělit na flavonoidy a neflavonoidy. Podtřídy neflavonoidů zahrnují fenolové kyseliny, jako je kyselina benzoová a skořicová. Flavonoidy lze rozdělit do podskupin flavonolů, flavonů, flavan-3-olů, flavanonů, isoflavonů, anthokyanidinů a chalkonů. Základní strukturu flavonoidů tvoří flavan, který se skládá ze dvou benzenových jader, které jsou spojené třemi uhlíky a ty spolu s kyslíkem tvoří heterocyklus [15].

Nalezenými fenolickými látkami ve sledovaných stromech jsou floridzin, floretin, kyselina chlorogenová a její deriváty, arbutin, rutin a kvercitrin. Největší koncentrace byla bez pochyb nalezena u floridzinu, a proto mu v následujících kapitolách bude věnována větší pozornost.

3.5.1. Floridzin

3.5.1.1. Výskyt floridzinu

Přítomnost floridzinu je spojována s plodem jabloně, jeho slupkou a dužinou. Ve studii Lata a kol. (2009) bylo porovnáno fenolické složení u 19 odrůd plodů jabloní. Obsah floridzinu

se pohyboval od 110 $\mu\text{g/g}$ DW ('Rubin') do 430 $\mu\text{g/g}$ DW ('Starking Delicious') [16]. Liaudanskas a kol. (2014) zjistili, že koncentrace floridzinu v plodech jabloně je 75,4 $\mu\text{g/g}$ DW ('Ligo') – 151,7 $\mu\text{g/g}$ DW ('Aldas') [17]. Pokud plody jablek rozdělíme na jednotlivé části, tak se floridzin nachází ve vyšších koncentracích ve slupce (37 $\mu\text{g/g}$ čerstvé hmotnosti (fresh weight, FW) – 172 $\mu\text{g/g}$ FW), zatímco v dužině pouze v rozmezí 8 $\mu\text{g/g}$ FW – 24,6 $\mu\text{g/g}$ FW [18]. Dále bylo zjištěno, že se floridzin vyskytuje i v džusu v rozmezí 0,52 mg/l – 20,13 mg/l [19]. Vyšší koncentrace jsou však přítomné v rostlinném materiálu ovocného stromu, jak je patrné z tabulky 1. Nízké koncentrace floridzinu lze nalézt i v jahodách (1,9 mg/100 g DW – 4,9 mg/100 g DW) [20].

Tabulka 1: Koncentrace floridzinu v různých částech jabloňového stromu.

Část ovocného stromu	Koncentrace floridzinu	Ref.
Celý plod jablka	52 mg/kg FW – 62 mg/kg FW	[21]
	75 mg/kg DW – 151 mg/kg DW	[17]
	110 mg/kg DW – 430 mg/kg DW	[16]
Dužina	87,8 mg/kg DW – 427,4 mg/kg DW	[22]
Semínka	2405 mg/kg DW – 8644 mg/kg DW	[22]
	2899 mg/kg DW – 19600 mg/kg DW	[22]
Stopka	3017 mg/kg DW – 40488 mg/kg DW	[22]
Větvičky	12940 mg/kg DW – 52370 mg/kg DW	[21]
Listí	18790 mg/kg DW – 24430 mg/kg DW	[23]
	20300 mg/kg DW – 52000 mg/kg DW	[24]
	46430 mg/kg DW – 98510 mg/kg DW	[25]
Kůra	25930 mg/kg DW – 91740 mg/kg DW	[21]
	54520 mg/kg DW – 102690 mg/kg DW	[25]
Pupeny	88290 mg/kg DW – 113800 mg/kg DW	[25]
Květy	34640 mg/kg DW – 53940 mg/kg DW	[21]

3.5.1.2. Floridzin - hyperglykémie, diabetes mellitus

Pozitivní účinky floridzinu jsou nejčastěji spojovány s úpravou glykémie a s léčbou diabetes mellitus 2. typu (DM2). DM2 je chronické, metabolické onemocnění

charakterizované zvýšenou hladinou glukózy v krvi, které časem vede k poškození srdce, cév, očí, ledvin a nervů. DM2, který je hlavní typ DM (90 %), je charakterizován poruchou citlivosti periferních tkání k účinku inzulínu a někdy je i snížena sekrece inzulínu beta-buňkami. Podle Mezinárodní diabetologické federace (IDF) způsobil DM2 roce 2019 4,2 milionů úmrtí. Onemocnění je potvrzeno při laboratorním změření koncentrace glukózy v plazmě na lačno. Tato hodnota je vyšší nebo rovna 7,0 mmol/l [26,27].

Glukóza, jako polární molekula, je do oběhu transportována přes membránu dvěma mechanismy: usnadněnou difúzi skrz GLUT a aktivním transportem přes SGLT receptory. V enterocytech a v buňkách proximálního tubulu ledvin se glukóza vstřebává aktivním transportem přes SGLT 1 (především tenké střevo, dále renální tubulární epitel) a SGLT 2 (renální proximální tubulární epitel). Přenos glukózy zajišťuje ko-transport s Na⁺ [28].

Jeden z terapeutických přístupů při léčbě DM2 je inhibice transportéru SGLT 2, což vede k indukci glykosurie. Tato tzn. glukuretika zbavují organismus nadbytečné glukózy zamezením reabsorpce glukózy v ledvinách a redukuje hyperglykémii. Limitací flordizinu je však jeho rozklad v tenkém střevě na jeho aglykon (phloretin) enzymem laktáza-flordizin hydroláza, čímž je značně snížena jeho biologická dostupnost. Cílem mnoha farmaceutických společností je vývoj analogů založených na flordizinu se zlepšenou biologickou dostupností a stabilitou, včetně vyvinutí selektivních SGLT 2 inhibitorů (například Dapagliflozin, C-glykosid flordizinu, který byl v roce 2012 schválen pro léčbu DM2) [28]. Přes uvedené nedostatky má samotný flordizin uplatnění v korekci postprandiální glukózy vlivem inhibice SGLT1 v buňkách střevního epitelu [29].

3.5.1.3. Studie s pacienty

Cílem studie Makarova a kol. (2015) bylo připravit jablečný prášek a sledovat efekt na snížení glykemie u šesti dobrovolníků - žen. Studie využila nezralá jablka z důvodu nižšího množství cukru. Účastníci byli vystaveni orálnímu glukózovému tolerančnímu testu (OGTT) a to s (25 g; koncentrace flordizinu 12,61 mg/g) nebo bez přídavku jablečného prášku. Průměrná koncentrace glukózy u dobrovolníků byla 5,7 mmol/l před OGTT. Po provedení OGTT se zvýšila koncentrace glukózy přibližně o 4 mmol/l, ale po provedení OGTT společně s jablečným práškem bylo zvýšení dvakrát nižší. Koncentrace glukózy v moči byla pětinašobně vyšší. Sušené a práškované výlisky z nezralých jablek lze tak použít jako zdravý prospěšný přírodní produkt

ke snížení postprandiální glykémie a ke zlepšení zdravotního stavu pacientů s diabetem. Příznivý efekt je pravděpodobně způsoben navázáním floretinu na SGLT 1, čímž se zabrání navázání a absorpci glukózy [30].

Podobně, ve studii s 10-ti zdravými muži, Schulze a kol. (2014) podali dobrovolníkům OGTT s a bez extraktu z jablek. Ve studii byl použit jablečný extrakt (2,8 g) obsahující floridzin o koncentraci 448 mg/g. Došlo ke snížení krevní glukózy a inzulínu v plazmě [31].

Shoji a kol. (2017) provedli dvojité zaslepenou studii u 33 jedinců s plazmatickou glukózou nalačno 5,6 mmol/l – 6,9 mmol/l, která je sice zvýšená, ale pod diagnostickým prahem pro DM. Během podávání po dobu 12 týdnů 600 mg/den jablečného extraktu, obsahujícího 10 % floridzinu (60 mg), 49 % prokyanidinů a 14 % flavanolů, došlo ke snížení nárůstu glukózy po OGTT u hraničních diabetických jedinců ve srovnání s placebem. U normoglykemických jedinců však nebyly žádné významné rozdíly. Tyto výsledky naznačují, že fenolické látky zlepšují glykémii u hraničních diabetických jedinců. Důležité také je, že nebyly hlášeny nežádoucí účinky [32].

V další studii byl 9-ti jedincům podáván čistý (11,7 mg/400 ml), zakalený (25,8 mg/ 400 ml) džus s uvedeným obsahem floridzinu a kontrolní nápoj. Všechny nápoje byly standardizovány na stejný obsah cukrů. Po konzumaci nebyly sledovány změny plazmatické koncentrace cukru. Během 3-hodinového intervalu pozorování však došlo k opožděné absorpci glukózy ve srovnání s kontrolním nápojem [33].

3.5.1.4. *In vivo* studie na laboratorních zvířatech

Diabetes mellitus, hyperglykémie, obezita. U kryš s vyvolaným DM je prokázáno, že orálně podaný extrakt obsahující floridzin vykazuje léčebný a preventivní efekt na hyperlipidémii a hyperglykémii při podání 30, 60 a 120 mg/kg floridzinu [34]. Dle této studie lze floridzin využít ve formě nápoje jako prevenci DM. Anti-hyperglykemický efekt floridzinu v dávce 20 mg/kg (intrastrické podání, i. g.) byl prokázán při snižování obezity a hyperglykémie u diabetických myší (typ 2). Došlo také ke snížení hladiny lipopolysacharidů, změně diabetické střevní mikroflóry a zvýšení počtu prospěšných bakterií [35]. Floridzin lze využít v prevenci obezity, zánětů a DM způsobené nesprávným stravováním, jak naznačuje studie, která podávala obézním myším stravu obohacenou o floridzin [36]. Další studie poukazuje na anti-hyperglykemickou aktivitu u myší vlivem podávání extraktu z listí jabloní.

Efekt z výtažku listí jablek byl zkoušen u myši, kterým byl nejprve odepřen přísun potravy po dobu 24 hodin a následně podán roztok cukrů (1 mg/kg), a to společně s výtažkem listí (1 mg/kg, p. o.) nebo bez. Ukázalo se, že u myši, kterým byl podán výtažek z jablek, došlo k výraznému snížení krevní glukózy. Také se hodnotil efekt jiných částí jabloně (řapík, slupka, ovoce) na postprandiální zvýšení krevní glukózy. Nejvyššího efektu se docílilo podáním výtažku z listí [37].

Onemocnění jater. Existuje studie zkoumající ochranný efekt floridzinu při poškození jater vyvolané léčbou methotrexátem (MTX). Studie byla provedena zatím jen na krysách, kterým byly podány dávky MTX a následně floridzinu 40 mg/kg – 80 mg/kg, p. o. Na základě biochemických markerů a histopatologických zkoušek došlo ke snížení projevů poškození jater. Podání floridzinu naznačuje zmírnění a časnou léčbu MTX-indukované hepatotoxicity u člověka [38].

Onemocnění srdce. Floridzin v dávce 20 mg/kg, i. g. snižuje hladinu proteinových markerů zvýšených při diabetické kardiomyopatii [39].

Antioxidační aktivita. Bylo zjištěno, že floridzin v dávce 2 mg/ml prodloužil životnost *Drosophila melanogaster* zvýšením antioxidačních enzymů (nejvýznamnější superoxid dismutáza, SOD) [40].

Nádorová onemocnění. Uvádí se, že floridzin má antiproliferativní účinky u několika buněčných linií rakoviny a bylo potvrzeno, že potlačuje růst nádoru na několika zvířecích modelech [41]. Například floridzin docosahexaenoát, vzniklý acylací floridzinu s mastnou kyselinou, má v dávce 100 mg/kg antimetastatický účinek na triple-negativní karcinom prsu (TNBC), jehož buňky na svém povrchu neexprimují žádné diagnosticky a terapeuticky významné receptory, a proto není možné využít cílenou léčbu a pacienti jsou odkázáni pouze na systémovou chemoterapii. Acylace je použita pro zvýšení buněčného příjmu a biologické dostupnosti [42].

Mikrobiom. Ve studii Zhang a kol. (2020) byly využity myši živené vysokotučnou stravou (high fat diet, HFD). Tako strava způsobila hyperglykémii, zvýšení triglyceridů, snížení lipoproteinů s vysokou hustotou. HFD tak přispívá k rozvoji obezity, DM2 a kardiovaskulárních chorob. Myším byla podávána normální dieta (ND) (kontrolní skupina) a dieta obsahující floridzin. Suplementace floridzinem pozitivně ovlivnila uvedené symptomy spojené s HFD,

zmírnila mikrobiální dysbiózu způsobenou HFD (úbytek *Clostridia*, *Bacteroidia*, *Desulfovibrionales*, *Bacteroidales*, *Desulfovibrion*, *Muribaculaceae* a *Bilophila*). Navíc došlo ke snížení rodů *Mucispirilu* a *Bilophila*, které jsou spojovány s obezitou. Byla zjištěna nižší hladina lipopolysacharidů v plazmě i ve fekáliích. U myším krmených floridzinem bylo zjištěno vyšší množství mastných kyselin s krátkým řetězcem (kyselina octová, propionová a máselná). I tato studie je přesvědčena o uplatnění floridzinu jako funkční potraviny [43]. Uvedené výsledky jsou v souladu s jinou studií [35].

3.5.2. Arbutin

Mezi přírodní zdroje arbutinu patří například medvědice lékařská (*Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng.) a brusinka obecná (*Vaccinium vitis-idea* L.) [44].

Záněty močových cest. Arbutin je hlavní účinnou látkou v medvědici lékařské. Její listy a přípravky z nich mají výrazné antibakteriální, adstringentní a diuretické vlastnosti. Ve dvojité zaslepené studii s 57 ženami mělo 5 z 27 žen ve skupině s placebem recidivu zánětu močových cest, zatímco u žádné z 30 žen ve skupině léčené pomocí medvědice nedošlo k opakovanému zánětu [44]. Extrakty z listů uvedené rostliny jsou oficiálně schváleny pro léčbu močových infekcí. Dle Evropské lékové agentury (EMA) je pro léčbu infekcí účinné množství 400 mg – 800 mg arbutinu denně podávaných ve 2 – 3 dávkách, což odpovídá infúzi připravené z 5 g – 10 g listů medvědice lékařské. Infuze je účinná především proti *Escherichia coli*, tedy nejčastějšímu patogenu způsobující infekci močových cest [45]. V rámci randomizované studie bylo také prokázáno, že podání arbutinu společně s ibuprofenem lze využít k účinné léčbě infekcí močových cest, a tím omezit spotřebu antibiotik [46].

Dermatologie, kosmetika a antioxidační aktivita. Arbutin společně s jinými aktivními látkami se hojně využívá ke snížení hyperpigmentace způsobené nadprodukcí melaninu. Po působení UV záření na kůži byl aplikován 10% roztok arbutinu a následně došlo ke snížení hyperpigmentace o 43,5 % a při současné aplikaci s aloesinem o 63,3 %. Cílem jiné studie bylo porovnat účinnost gelových formulací obsahujících arbutin (1 %), syntetickou kyselinu ellagovou (1 %) a rostlinné extrakty s kyselinu ellagovou. Všechny uvedené formulace měly statisticky významný vliv na melasma zjišťované u 30-ti pacientek. Jiná studie zahrnující 102 žen s melasma a lentigo hodnotila depigmentační účinnost krému na bázi rostlinného extraktu (2,51 % arbutinu). Během 8 týdnů se hladina melaninu snížila z 182,6 % na 168,76 %. Klinické

zlepšení bylo pozorováno u 75,86 % pacientek s melasma a 56 % s lentigo. Krém obsahující 4 % nikotinamidu, 3 % arbutinu, 1 % bisabololu a 0,05 % retinaldehydu byl aplikován na obličej jednou denně po dobu 60 dnů. Došlo ke snížení plochy melasmy z 1398,5 mm² na 923,4 mm². Melanin hraje důležitou roli v ochraně kůže tím, že absorbuje UV záření, které zároveň vytváří reaktivní formy kyslíku (ROS). Znečištění prostředí, UV záření, hormony a léky stimulují tvorbu ROS v melanocytech. ROS následně mohou podporovat melanogenezi nebo způsobit smrt melanocytů, což vede k hyperpigmentaci nebo hypopigmentaci. Akumulace oxidačního poškození vede k tumorigenezi. Bylo zjištěno, že arbutin snižuje hladiny ROS [47].

3.5.3. Rutin

Rutin a jiné flavonoidy jsou k nalezení v běžně konzumovaných potravinách jako cibule, jablka, čaj, červené víno [48].

Rutin je znám pro své uplatnění při onemocnění žil. V rámci klinické studie byl zjištěn pozitivní účinek léčivého přípravku založeném na rutinu k léčbě křečových žil, vnitřního krvácení a hemeroidů. Běžné perorální dávky se pohybují od 500 mg do 2000 mg denně a lze je používat dlouhodobě [49]. Bylo zjištěno, že perorální podávání rutinu (100 mg/kg) po dobu 45 dnů vedlo ke snížení plazmatické glukózy a zlepšení antioxidačního stavu v játrech, ledvinách a mozku u diabetických krys [48]. V rámci *in vivo* studií byl taky zjištěn protizánětlivý [50] a protirakovinný [51] účinek. Hlavní nevýhodou rutinu je jeho špatná biologická dostupnost, způsobená především jeho nízkou rozpustností ve vodě, špatnou stabilitou a omezenou membránovou permeabilitou. To je důvod, který brání *in vivo* biologickým účinkům rutinu.

3.5.4. Kyselina chlorogenová

Kyselina chlorogenová se běžně vyskytuje v potravinách a nápojích, jakými jsou čaj, káva (především zelená káva), bobulové ovoce, kakao, citrusové plody, jablka, hrušky [52].

Civilizační onemocnění. Dle review Naveed a kol. (2005) má kyselina chlorogenová řadu účinků potvrzených na *in vivo* studiích. Podílí se na redukci tělesné hmotnosti a na prevenci vzniku DM (typ 2) (působí na glukózu-6-fosfatázu, G6P, enzym zasahující do kontroly krevní glukózy). Na základě mnoha studií působí jako antioxidant a je užitečná při zánětlivých onemocněních [52]. Během klinické (randomizované) studie na 117 jedincích s hypertenzi byl

prokázán anti-hypertenzní účinek po podávání extraktu z kávových zrn (bohatý zdroj) po 28 dnech p. o. aplikace a to bez nežádoucích účinků [53].

Mikrobiom. Navíc, kyselina chlorogenová zvrátila dysbiózu střevní mikroflóry vyvolanou vysokotučnou stravou u myši, včetně významné inhibice růstu *Desulfovibrionaceae*, *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae*, *Erysipelotrichaceae* za prospěšného osídlení *Bacteroidaceae*, *Lactobacillaceae* [54]. V jiné studii byl zjišťován efekt diety s vysokými dávkami kyseliny chlorogenové na prasečí střevo. Došlo k prodloužení střeva, což naznačuje, že tako kyselina může být nápomocná při trávení a vstřebávání živin v tenkém střevě. Dále byla zjištěna zvýšená aktivita diaminooxidázy a koncentrace MHC glykoproteinů 2. třídy. I tento model obsahoval vyšší výskyt *Lactobacillaceae*, dále pak *Prevotellaceae* či *Prevotellaceae* [55].

Další účinky. Kyselina chlorogenová vykazuje antimikrobiální účinky a zároveň není citlivá vůči probiotickým bakteriím, díky čemuž je vhodná v potravinářském průmyslu (například jako konzervant). Studie poukazují na baktericidní účinek vůči *Stenotrophomonas maltophilia*, *Klebsiella pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* a *Staphylococcus aureus*. Účinkuje i proti houbám (*Candida albicans*) a nachází uplatnění u virových onemocnění (HIV, adenoviry a jiné) [52].

3.5.5. Kvercitrin

Kvercitrin stejně jako jiné flavonoidy lze nalézt v běžně konzumovaných potravinách (čaj, cibule, jablka, červené víno) [48].

Vypadávání vlasů. Kvercitrin má možný terapeutický potenciál pro prevenci a/nebo léčbu vypadávání vlasů. Bylo zjištěno, že kvercitrin stimuluje energetický metabolismus a zvyšuje produkci růstových faktorů nezbytných pro růst vlasů. Účinek kvercitrinu byl zkoumán na modelu lidských vlasových folikulů. Kvercitrin významně zvýšil růst vlasů ve srovnání s kontrolou. Konkrétně došlo k nárůstu o 62,4 % (5 μ M) a 70,0 % (10 μ M). Pozitivní kontrola minoxidil (schválený léčivý přípravek) vykazovala srovnatelný výsledek [56].

Další účinky. Studie ukazují na terapeutické účinky pro léčbu trombotických onemocnění, což bylo dokázáno u myši s indukovanou mrtvicí. Při orálně podávaném kvercitrinu došlo ke snížení poškození mozku [57]. V rámci *in vitro* studií byl prokázán

antioxidační, protizánětlivý, protinádorový a taky antidepressivní účinek. Krotě toho byl zjištěn protektivní vliv kvercitrinu na poškození jater [58].

3.5.6. Floretin

Floretin je součástí chemické třídy dihydrochalkonů, které se nachází hlavně v ovoci a to především v jablcích a hrušních [59].

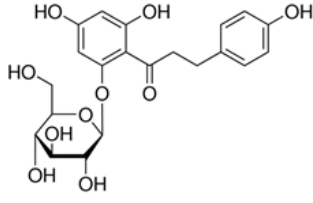
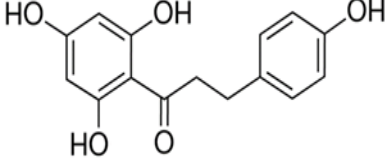
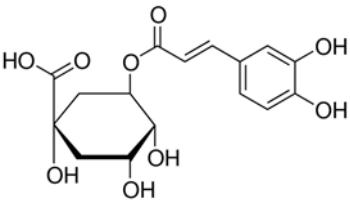
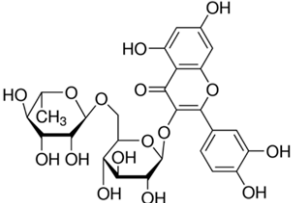
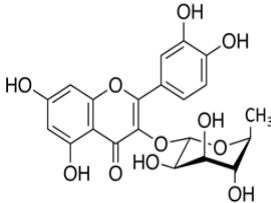
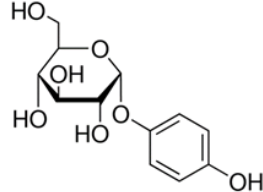
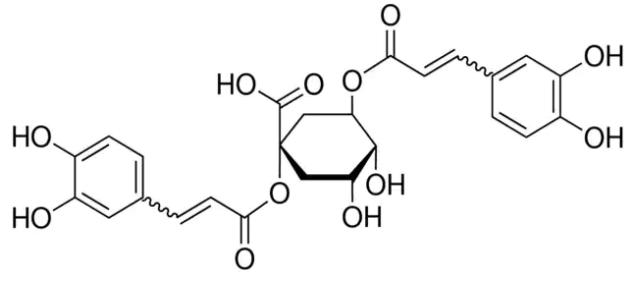
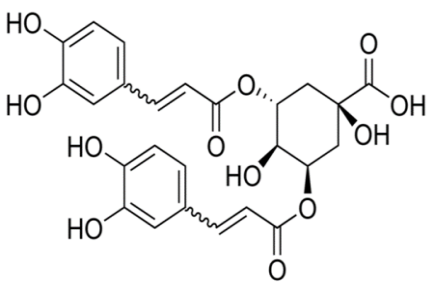
Uplatnění v dermatologii. Floretin má nejspíš vzhledem k jeho nižší lipofilitě ($\log P = 2,23$) schopnost penetrovat přes kůži (prozatím vyzkoušeno jen s prasečí kůží). Je prokázán jeho proti-stárnoucí a depigmentační efekt na pokožku. Lze ho využít při léčbě akné. Byl zjištěn silnější antibakteriální efekt proti *Cutibacterium acnes* (hlavní původce akné) než standardně používaný prostředek (benzoylperoxid) a zároveň studie uvádí, že se jedná o bezpečnější variantu. Klinická studie zkoumající topické aplikace přípravku s 0,05% floretinem po dobu 1 měsíce prokázala klinicky a statisticky významné snížení počtu komedonů a produkci kožního mazu. Bohužel, floretin má špatnou rozpustnost ve vodě, což je výzvou pro jeho začlenění do hydrogelových formulací. Jedním z řešení je vyvinutí komplexu floretinu s hydroxypropyl- β -cyklodextrinu. U samotného floretinu došlo k 50% degradaci, zatímco u komplexu bylo degradováno jen 12,7 %. Rovněž jsou prokázány chemoprotektivní a chemoterapeutické účinky floretinu na melanom. Na trhu lze nalézt floretin obsažený v kosmetice, které jsou primárně určeny proti stárnutí pokožky a proti vráskám [60].

Onemocnění střev a mikrobiom. Orálně podávaný floretin výrazně zlepšil patologické poškození střev u myši s indukovanou ulcerózní kolitidou. Navíc došlo ke snížení koncentrace lipopolysacharidů a byly příznivě vyrovnány hladiny *Escherichia coli* a *Lactobacillus*. Podávání floretinu tak může být novou dietární strategií v léčbě ulcerózní kolitidy. Je všeobecně známo, že mikrofóra střev je spjata s několika dermatologickými patologiemi (například akné, atopický ekzém, psoriáza) [61].

Obezita a glykémie. Rovněž floretin, stejně jako ostatní studované látky v této práci, má pozitivní vliv na glykémii a obezitu. *In vivo* studie prokázala, že podávání floretinu myším (75 mg/kg, i. p., třikrát týdně po dobu šestnácti týdnů) snižuje hladinu krevního cukru. Dále, floretin (10 mg/kg, i. p., jednou za dva týdny) zabraňuje rozvoji obezity u myši krmených dietou s vysokým obsahem tuků a taky zlepšil homeostázu glukózy a citlivost na inzulin [60].

3.6. Fyzikálně-chemické vlastnosti stanovených fenolických látek

Tabulka 2: Fyzikálně-chemické vlastnosti stanovených fenolických látek.

	Floridzin	Floretin	Chlorogenová kyselina
Struktura			
M _w	436,4 g/mol	274,27 g/mol	354,31 g/mol
Log P	0,45	2,23	0,17
pKa	7,89	7,96	3,33
	Rutin	Kvercitrin	Arbutin
Struktura			
M _w	610,52 g/mol	448,38 g/mol	272,25 g/mol
Log P	0,15	1,31	-1,4
pKa	6,37	6,37	9,82
	1,5-dikafeoylchinová kyselina		3,5-dikafeoylchinová kyselina
Struktura			
M _w	516,45 g/mol		516,45 g/mol
Log P	2,07		2,05
pKa	3,18		3,28

M_w = molekulová hmotnost.

Log P = rozdělovací koeficient; informuje o polaritě.

pKa = disociační konstanta; informuje o acidobazických vlastnostech.

Struktury převzaty ze zdroje [62], ostatní údaje z [63].

3.7. Stanovení fenolických látek v rostlinném materiálu

Stanovení fenolických látek závisí na různých parametrech, kterými jsou chemické vlastnosti zkoumaných analytů, použitá extrakční metoda a interferující složky ve vzorku. Nejčastěji se pro separaci a stanovení fenolických látek využívají metody kapalinové chromatografie. Mezi další relevantní metody patří spektrofotometrie [64], plynová chromatografie [65], kapilární elektroforéza [66]. Detekční systém by měl selektivně detekovat stanovované analyty a odlišit je od interferujících složek. Na základě odborných publikací jsou nejpoužívanějšími spektrofotometrické detektory, ale v poslední dekádě narůstá zájem o hmotnostní spektrometry. Naopak četnost používání fluorescenčních a elektrochemických detektorů klesá [67].

Kapalinová chromatografie neustále prochází různými úpravami. Části systému (detekční systémy), příslušenství (kolony a předkolony) zvyšují svoji kvalitu s cílem co nejrychlejší a nejúčinnější chromatografické separace. Mezi hlavní trendy patří použití nových typů kolon, ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie, superkritická fluidní chromatografie či dvourozměrná chromatografie.

3.7.1. Kapalinové chromatografie

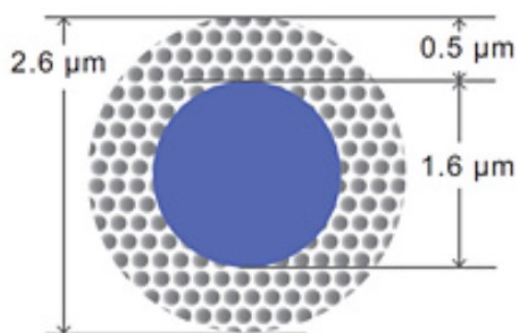
První zmínky o kapalinové chromatografii pochází ze začátku 20. století. Zakladatelem je botanik rusko-italského původu - Michail Semjonovič Cvět, který v rámci své diplomové práce poprvé provedl chromatografickou separaci listových barviv. Principem kapalinové chromatografie je mnohonásobné ustalování rovnováhy mezi separovanými analyty a mobilní (MF) a stacionární (SF) fází. Základní přístrojové uspořádání se skládá ze zásobníků MF, odplyňovače (degaser), vysokotlakého čerpadla, směšovače, dávkovače vzorku, kolonového prostoru v termostatu, detektoru, počítače se softwarem a nádoby na sběr odpadu. Je-li složení MF během analýzy konstantní, hovoříme o izokratické eluci. Pokud se složení MF mění, jedná se o gradientovou eluci. Rozlišujeme chromatografii na normální fázi (SF je polární), která je v dnešní době nahrazována chromatografií na reverzní fázi (reversed phase, RP; SF je nepolární). Grafickým výstupem analýzy je chromatogram, který znázorňuje analyty ve formě píků. Chromatogram poskytuje kvalitativní (retenční čas, t_R) a kvantitativní údaje (plocha pod píkem, A) [67].

Při analýze rostlinných matric se ve vzorku většinou nachází množství fenolických látek vyskytujících se ve formě glykosidů a aglykonů. To se projevuje různými lipofilními vlastnostmi (tabulka 2), a proto se používá gradientová eluce. Mobilní fáze obsahuje organickou část (methanol, acetonitril) a okyselenou vodní část. K samotné separaci dochází v koloně (100 – 300 mm, vnitřní průměr 2,1; 3,0; 4,6 mm) naplněné částicemi s reverzní fází. Nejčastěji jsou využívány částice silikagelu modifikované funkčními skupinami (– C₁₈, – NH₂, – C₈, – CN) o velikosti 3 – 5 μm pro HPLC analýzy.

3.7.2. Trendy ve stacionárních fázích

Cílem moderních stacionárních fází je odstranění nedostatků klasického silikagelu. Jeho nevýhodou je omezená chemická (pH = 2 – 7) a teplotní (do 60 °C) stabilita, a tlakový limit v rozmezí 35 – 40 MPa (pro HPLC). Problematická je přítomnost volných silanolových skupin, které mohou interagovat s analytem. Komplikovaná je hlavně analýza bazických látek. Báze v kyselém pH prostředí získávají náboj, ionizují se, a pokud interagují s nábojem silanolu, dochází ke chvostování píku. V dnešní době je většina kolon opatřena tzv. endcappingem (nejčastěji trimethylsilan), který maskuje volné silanolové skupiny. Nikdy však nedochází ke 100% pokrytí. Další možností je zavedení polárních skupin (například karbamátová, amidová skupina) do SF, tzv. shield nebo embedded phases, které stíní volné silanolové skupiny. Příkladem lze uvést kolonu Ascentis Express RP amid, která je navíc opatřena endcappingem. Tato kolona byla využita při separaci fenolických látek v rostlinném materiálu hrušně (viz praktická část).

Nedostatky eliminují také polymerní SF, hybridní SF, SF na bázi oxidu kovů (oxid zirkoničitý, oxid hlinitý) a porézního grafitického uhlíku. Zmíněné stacionární fáze nabízí možnost většího pH rozmezí (až do pH = 12), použití vyšší teploty (až 200 °C) a mnohdy i větší mechanickou odolnost. Jinými možnostmi pro zvýšení účinnosti, a především rychlosti separace fenolických látek je použití kolon s povrchově porézními částicemi (core-shell kolony). Tyto kolony se skládají z pevného jádra (obsahuje neporézní silikagel; zde nedochází k separaci) a povrchové vrstvy (modifikovaný silikagel; kde dochází k vlastní separaci). Struktura částice s obvyklými rozměry je vyobrazena na obrázku 1. Dalším přístupem je použití monolitických kolon, které neobsahují částice, ale jsou tvořeny jedním kusem materiálu [67].



Obrázek 1: Struktura povrchově porézní částice [68].

Jako další příklad lze uvést moderní SF YMC Triart. Jedná se o typ organicko-anorganického hybridního silikagelu. Unikátní technologie je založena na vícevrstevných částicích, které jsou vyráběny prostřednictvím mikroprůtokového reaktoru. Zmíněnou SF lze použít v pH rozmezí 1 – 12, při teplotě až do 90 °C a nabízí vysokou separační účinnost. Tato kolona byla použita pro separaci fenolických látek v rostlinných částech jabloně (viz praktická část) a je předmětem zájmu studie Adamcová a kol. (2022) [25].

3.7.3. Moderní směry systému HPLC

Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC). U UHPLC dochází k urychlení analýz a k efektivnějším separacím v kratším čase. Jsou zde však kladeny vysoké nároky na instrumentaci. Základním předpokladem jsou minimální kolonové objemy redukující disperzi separovaných zón. Čerpadlo umožňuje stabilní průtok při velmi vysokých tlacích (až 150 MPa). Dávkovací zařízení je rychlé a přesné (už to urychluje analýzu) a dávkuje malé objemy vzorku. Detektory umožňují rychlý sběr dat a detekční cela má objem 0,5 μl – 2 μl . Pro UHPLC separace se typicky používají kratší kolony (50 mm – 100 mm, vnitřní průměr většinou 2,1 mm) s částicemi o velikosti 1,5 μm – 2,0 μm . Využívají se hybridní kolony, modifikovaný silikagel a kolony s povrchově porézními částicemi o velikosti < 3 μm nebo < 2 μm [67]. Tato instrumentace byla například použita pro identifikaci a kvantifikaci fenolických sloučenin a triterpenoidů v deseti odrůdách hrušní [69].

Superkritická fluidní chromatografie (SFC). SFC je v dnešní době stále se rozvíjející separační technika. Také SFC pracuje s vyšším rozlišením a doba analýzy je kratší. Jejím typickým znakem je použití superkritické tekutiny jako mobilní fáze. Principem je zahřívání a

stlačování kapaliny nebo plynu nad jejich kritické hodnoty. Nejčastěji se používá oxid uhličitý (CO₂), jejíž kritická teplota (T_c) je 31,1 °C a tlak (P_c) je 73,7 barů. Výhodou CO₂ je nízká cena, dobrá dostupnost, nízká viskozita. Je chemicky stabilní, netoxický a nehořlavý. Nevýhodou je nízká polarita a slabá eluční síla. Díky tomu dochází ke špatné eluci polárních a vysokomolekulárních látek. Řešením je však přidání modifikátoru (například metanol, acetonitril, etanol), který má vliv na zvýšení rozpustnosti analytu, zvýšení eluční síly MF a pozitivní vliv na tvar píku. Metoda je levná, má nízké náklady a vysokou separační účinnost. Na druhou stranu je SFC finančně náročná na pořízení. Jako SF se používají speciální pro SFC nebo jakékoliv jiné používané v LC. Jmenovitě lze použít chirální (například deriváty amylosy a celulosy) či achirální (polární: 2-ethylpyridin; aromatické: propylfenyl; nepolární: C18; nepolární s vloženou polární skupinou: C18 + iontoměnič) SF. Kromě toho, SFC splňuje nároky na zelenou chromatografii [67]. SFC lze aplikovat v analýze přírodních produktů [70], léčiv [71], potravin [72] a mnoha jiných vzorků. V rámci analýzy fenolických látek byla SFC využita v jejich stanovení například v česneku [66].

Dvourozměrná kapalinová chromatografie (2D-LC). 2D-LC se využívá k analýze velmi komplexních vzorků (100 – 1000 komponent) a u chemicky podobných látek, které se těžce separují. Vzorek je podroben dvěma různým chromatografickým procesům z důvodu dosažení vyšší rozlišovací schopnosti. Mechanismy separace musí být odlišné (například hydrofilní interakční chromatografie vs. chromatografie na reverzních fázích). Jednotlivé systémy jsou propojeny ventilem. Tuto metodu lze provozovat on-line a off-line [67]. 2D-LC v uspořádání LC × LC byla využita pro stanovení profilu fenolických sloučenin v různých odrůdách jablek [73].

3.7.4. Detekce fenolických látek v kapalinové chromatografii

Ze struktury fenolických látek je patrné, že díky přítomnosti konjugovaných dvojných vazeb je možná detekce, která je založená na principu spektrofotometrie. Jednoduché UV detektory byly nahrazeny modernějšími DAD. Výhodou DAD detektorů je snímání celého spektra vlnových délek v reálném čase bez přerušení separace, což je výhodné u fenolických látek, protože pokrývají širší spektrum absorpčních maxim. K identifikaci dochází porovnáním retenčních časů analytu se standardem. Pro zvýšení selektivity detekce lze využít programy umožňující vytvářet knihovny spekter a porovnat snímaná spektra s touto knihovnou. DAD

detektor dále umožňuje ověřování spektrální čistoty píku pomocí 3D dat a odhalit případnou koeluci.

Pro dosažení lepší citlivosti a selektivity lze alternativně využít fluorescenční detektory. Velmi vysokých citlivostí je dosaženo použitím fluorescenčního detektoru s laserem indukovanou fluorescencí. Nevýhodou je však nutnost derivatizace, která může prodloužit proces analýzy. Srovnatelné citlivosti (někdy i lepší) s fluorescenčními dosahují elektrochemické detektory, jejichž popularita (společně s fluorescenčními) klesá. Další výhodou je dosažení nízkých limitů detekce. Elektrochemické detektory se využívají u látek, které jsou schopné oxidačně/redukčních dějů. Oxidovatelné jsou zejména látky obsahující hydroxylovou funkční skupinu vázané na aromatický skelet, mezi které patří fenolické látky. Vyšší nároky jsou kladeny na mobilní fázi, která musí být vodivá, dokonale čistá a odplyněná [67].

Publicitě v detekci fenolických látek v rostlinné materiálu se v poslední době těší hmotnostní spektrometrie. Tyto detektory jsou citlivé, selektivní, relativně univerzální, ale destruktivní. Proces detekce spočívá ve třech krocích: ionizace vzorku, rozdělení iontů dle poměru m/z a samotná detekce iontů. Ve spojení s HPLC se především pro polární a středně polární látky využívá ionizace elektrosprejem (ESI). Podmínkou je použití těkavých MF (například methanol, acetonitril, voda, ethanol) a aditiv (například kyselina mravenčí, octová). Aditiva se nesmí používat ve vysokých koncentracích (doporučená koncentrace zmíněných aditiv je $< 0,1\%$), aby nedocházelo k soutěžení o náboj mezi analytem a aditivem, což by mohlo vést ke snížení účinnosti ionizace analytu a citlivosti stanovení detekce. Nevhodné je použití kyseliny fosforečné, která se u HPLC-DAD využívá často. Zmiňovaná netěkavá kyselina zapříčiňuje tvorbu depozitů na kovových částech přístroje, což vede ke snížení citlivosti. Další podmínkou je použití rozpouštědel a aditiv o velmi velké čistotě (LC-MS grade). Při použití ESI i jiných ionizačních technik (například APCI) není možné porovnávat s knihovnou spekter, protože pro LC-MS neexistují. Ke kvantifikaci lze využít cílenou a necílenou analýzu. Cílená analýza se používá pro známé a očekávané látky a využívá se módu SIM (selected ion monitoring) a SRM (selected reaction monitoring). Necílená analýza spočívá ke kvantifikaci neznámých látek [67,74].

3.7.5. Přehled studií zabývajících se stanovením fenolických látek v ovocných stromech

Tabulka 3: Přehled publikovaných prací zaměřující se na HPLC analýzy fenolických látek v materiálu ovocných stromů.

Vzorek	Analyty	Mobilní fáze	Kolona	Detektor	Ref.
Listy, kůra, plody hrušní	arbutin	7% metanol	ACE 5 C-18 (250 mm × 4,6 mm, vel. částic 5 μm)	UV-VIS	[75]
Listy hrušní	arbutin, deriváty arbutinu, kyselina hydroxyskořicová, kyselina chlorogenová, kyselina p-kumarová, deriváty kyseliny p-kumarové a flavonolové glykosidy	A: MeOH B: H ₂ O + 5% HCOOH	Hypersil ODS (250 × 4 mm, velikost částic 3 μm)	DAD	[76]
Listy a plody jabloní a hrušní	kyselina gallová, kyselina neochlorogenová, katechin hydrát, kyselina chlorogenová, kyselina vanilová, kyselina kávová, kyselina syringová, epikatechin, kyselina p-kumarová, kyselina ferulová, kyselina sinapová, kyselina salicylová, kyselina ellagová, rutin, myricetin, kvercetin, kaemferol	A: MeOH B: H ₂ O + 1% CH ₃ COOH	Hypersil Gold (150 × 4,6)	DAD	[77]
Listy, kůra, pupeny, květy, plody jabloní	floridzin, floretin, kyselina chlorogenová, rutin	A: ACN B: H ₂ O + 0,1% H ₃ PO ₄	YMC Triart C18 ExRS (150 × 4,6 mm, velikost částic 5 μm)	DAD	[21]
Listy jabloní	avikularin, kvercetin-3-galaktosid, kyselina kávová, katechin, epikatechin, kyselina chlorogenová, isokvercitrin, floretin, floridzin, kvercitrin, rutin	A: ACN B: H ₂ O + 2% CH ₃ COOH	YMC-Pack ODS-A C18 (250 × 4,6 mm, velikost částic 5 μm)	DAD	[78]
Listy jabloní	kyselina chlorogenová, isokvercitrin, kvercitrin, kys. p-hydroxybenzoová, kvercetin-3-galaktosidáza, floridzin, rutin	A: ACN B: 1 mM H ₃ PO ₄	Thermo Scientific Aquasil C18 (250 × 4,6 mm, velikost částic 5 μm)	DAD	[79]
Listy jabloní	epikatechin, isokvercitrin, kvercitrin, floretin, floridzin	A: ACN B: 0,01% C ₂ HF ₃ O ₂	Synergi MAX RP80, C12 (250 × 4,6, velikost částic 4 μm)	DAD	[23]

Dle uvedených studií se jako mobilní fáze nejčastěji využívá acetonitril či metanol s využitím gradientové eluce. K separaci dochází v kolonách délky 150 mm – 250 mm v uspořádání reverzní chromatografie. K detekci se velmi často používá DAD detektor.

3.8. Validace analytických metod

Validaci se rozumí proces, který má prokázat, že vyvinutá metoda je vhodná pro zamýšlené použití. Je nezbytná v rámci kontroly kvality. Validací proces se řídí dle směrnic organizací, které se zabývají validací analytických metod jako například European Medicines Agency (EMA), Food and Drug Administration (FDA) nebo International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). Farmaceutické analýzy musí dodržovat doporučení dle The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Těmito předpisy se řídí i potravinové či environmentální analýzy s některými odlišnostmi [74].

Test způsobilosti chromatografického systému (System Suitability Test, SST) je test vhodnosti a validity chromatografického systému. Provádí se na začátku měření, při každém zásahu do systému, nebo při podezření na chybně fungující systém. SST by měl obsahovat alespoň dva parametry. Akceptační kritéria mohou být vyžadována autoritou (FDA, EMA a jiné) nebo jsou nastavena vlastní kritéria. Mezi parametry SST patří faktor symetrie, opakovatelnost nástřiku, rozlišení, počet teoretických pater či retenční faktor [74].

Mezi vlastní validační parametry analytických metod dle ICH patří přesnost (míra shody mezi jednotlivými výsledky opakovaně prováděné s homogenním vzorkem), správnost (míra shody mezi naměřenou hodnotou se správnou hodnotou), linearita (schopnost metody dávat výsledky přímo úměrné koncentraci stanovované látky ve vzorku), limit detekce/kvantifikace (nejmenší množství analytu ve vzorku, které je možné detekovat/stanovit s přijatelnou přesností a správností), selektivita (schopnost metody změřit analyzovanou látku v přítomnosti dalších látek, jejichž přítomnost je očekávána), robustnost (schopnost metody zůstat nedotčenou malými, ale záměrnými odchylkami) [74].

3.9. Příprava rostlinného materiálu pro analýzu

Úprava vzorku (rostlinného materiálu) představuje pre-analytickou část analýzy. Jedná se o časově náročný proces, který je bohužel nejvíce náchylný k chybám. Provádí se z důvodu izolace analytů, přečištění, odstranění interferencí a eliminaci matricových efektů. Cílem v následných chromatografických analýzách je připravit vzorek, který je dokonalé rozpustný v MF [67].

Rostlinný materiál určený k extrakci musí být dokonale usušen. K sušení dochází na čerstvém vzduchu nebo pomocí lyofilizace. Lyofilizace výrazně zkracuje dobu sušení a zachovává více fenolických látek [80]. Dalším krokem je důkladná homogenizace, která je kritická pro výtěžnost analytů [25]. Extrakce je závislá na typu rozpouštědla (metanol, acetonitril, etanol), teplotě a na chemickém složení vzorku. Navíc, fenolické látky mohou být přítomné v různých koncentračních hladinách. Z tohoto důvodu neexistuje univerzální extrakční technika. Mezi extrakční techniky patří například:

Macerace. Jedná se o jednoduchý proces skládající se z namáčení vzorku ve vhodném rozpouštědle v uzavřeném systému při konstantním mícháním a pokojové teplotě. Po extrakci následuje proces oddělení pevných částí od rozpouštědla pomocí filtrace či dekantace. Ačkoli je to snadná technika, má nevýhodu v tom, že je časově náročná a vyžaduje rozpouštědla ve velkých objemech [81].

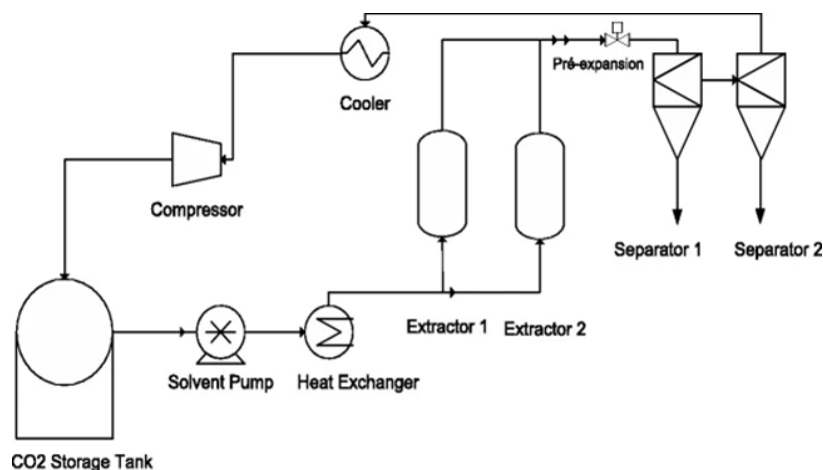
Extrakce ultrazvukem (ultrasound-assisted extraction, UAE). Jedná se o jednoduchou a levnou metodu. Ultrazvukové vlny působí na buněčné stěny a membrány vzorku, čímž dochází ke zvýšení propustnosti. Proces obecně vyžaduje použití ultrazvuku s frekvenčním rozsahem mezi 20 a 2000 kHz. Optimalizačním krokem je dále čas extrakce [81]. Tento typ extrakce byl využit například ve studiích Táborský a kol. (2021) a Stoenescu a kol. (2022), kteří použili ultrazvuk po dobu 30 minut k extrakci fenolických látek z plodů a rostlinného materiálu ovocných stromů [21,77].

Extrakce podporována mikrovlnným ohřevem (microwave assisted solvent extraction, MASE). U této extrakce se používají mikrovlnné záření k zahřátí rozpouštědla a složek směsi. Vzniklé teplo usnadňuje difuzi rozpouštědel do vzorku. Předností MASE je úspora času a malé objemy rozpouštědla [81]. MASE byla například použita pro extrakci fenolických látek z listů

olivovníku, která byla neúčinnější při teplotě 86 °C. Také bylo zjištěno, že MASE měla vyšší výtěžky analytů ve srovnání s metodou macerace a UAE [82].

Superkritická fluidní extrakce (SFE). Tato moderní metoda je šetrná k životnímu prostředí. Jako rozpouštědlo je nejčastěji používána superkritická tekutina - oxid uhličitý (CO₂). Jeho kritická teplota je 31,1 °C; tlak 7,38 MPa a hustota 470 kg/m³. CO₂ je netoxický, levný a bezpečný. Nevýhodou je nízká polarita CO₂, což činí tuto metodu nevhodnou pro polární fenolické látky. Možným řešením pro zvýšení polarity je přidavek metanolu, etanolu, acetonitrilu a jiných modifikátorů obvykle v koncentracích 2 – 5 % [67].

SFE (obrázek 2) se často používá k extrakci nepolárních sloučenin. Je alternativní technikou ke konvenčním extrakčním metodám (Soxhlet) díky svým výhodám - nízké hustotě a viskozitě superkritického CO₂ a také vysoké difuzivitě. CO₂ je navíc nehořlavý a „zelený“, takže nemá zásadní dopad na životní prostředí. Optimalizace tlaku a teploty může zvýšit účinnost extrakce. Extrakce fenolických sloučenin z rostlinných materiálů s použitím CO₂ v superkritickém stavu byla studována v teplotním rozmezí 25 °C – 120 °C a tlakovém rozmezí 80 – 655 bar [83]. Například, Reátegui a kol. (2014) použili čistý CO₂ k extrakci antioxidantů z *Baccharis dracunculifolia* za optimálních podmínek 60 °C a 400 bar, což vedlo k 2krát vyššímu výtěžku (4 mg/g) ve srovnání s výtěžkem metanolových a ethanolových extraktů [84].



Obrázek 2: Zjednodušené schéma procesu SFE, skládající se z pumpy (solvent pump), výměníku tepla (heat exchanger), extraktor (extractor), kompresor (compressor), chladiče (cooler), separátoru [85].

Magnetické molekulárně vtištěné polymery (MMIPs). MMIPs představují selektivní materiály používané pro extrakci na tuhou fázi. Sorbenty jsou připravovány různými metodami (kovaletní nebo nekovalentní vtištění). Extrahovaný analyt je zadržován na základě molekulárního tvaru, velikosti a uspořádání funkčních skupin. Výhodou je jednoduché provedení, stabilita a selektivita. Naopak nevýhoda spočívá v dlouhém extrakčním čase, použití velkého objemu rozpouštědla a v riziku degradace materiálu [86].

Rostlinný materiál obsahuje značné množství silně vazebných složek, jako je chlorofyl, proteiny a další endogenní látky, které mohou ohrozit separační účinnost analytické kolony. Pro ochranu kolony lze využít předkolonu [87].

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Analyzované vzorky

HPLC analýza fenolických látek byla provedena u 10 odrůd jabloní a 10 odrůd hrušní. U obou typů stromů bylo sledovaným materiálem listí, kůra, pupeny, květy a štěpka. Pro sledování měnícího se fenolického profilu byl zmíněný materiál odborně odebírán 4krát ročně s ohledem na dostupnost. Rostlinný materiál jabloně byl odebrán v období březen – duben 2020, červen 2020, srpen – září 2020 a říjen – listopad 2020. Chemická analýza byla provedena u odrůd 'Topaz', 'Golden Delicious', 'Angold', 'Meteor', 'Melrose', 'Fuji', 'Braeburn', 'Lady Silvia', 'Rubinstep' a 'Rubín'.

Vzorky hrušně byly odebrány v období srpen – září 2019, říjen – listopad 2019, březen – duben 2020 a červen 2020 u odrůd 'Lucasova', 'Thirriotova', 'Grosdemange', 'Charneuská', 'Highland', 'Wiliamsova', 'Wiliamsova červená', 'Konference', 'Clapova' a 'General Leclerc'. Ovocné stromy pocházely z výsadby Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského Holovousy, s.r.o. Hned po odběru byly vzorky usušeny při pokojové teplotě a takto skladovány do doby zpracování. Směsný vzorek štěpky byl připraven smícháním různých odrůd jabloní ('Golden Delicious', 'Lady Silvia', 'Rubinola', 'Angold') a hrušní ('Konference', 'Clapova', 'Lucasova', 'Charneuská').

4.2. Chemikálie a činidla

Pro vývoj HPLC metod a další analýzy byly použity tyto standardy: floretin ($\geq 99\%$), floridzin dihydrát (99%), kyselina chlorogenová ($\geq 95\%$), kvercitrin ($\geq 78\%$), rutin ($> 94\%$), arbutin ($\geq 98\%$), kyselina dihydroxybenzoová (98%) od dodavatele Sigma – Aldrich (Praha). Kyselina 1,5-dikafeoylchinová ($\geq 98\%$) a kyselina 3,5-dikafeoylchinová ($\geq 98\%$) byly dodány od Chem – Faces (Čína).

Mezi použité rozpouštědla a chemikálie patřily kyselina mravenčí, acetonitril a metanol od dodavatele Sigma – Aldrich (Praha) a kvality gradient-grade. Ultra-čistá voda byla vyrobena přístrojem Milli-Q (Millipore, Bedford).

4.3. Příprava vzorku

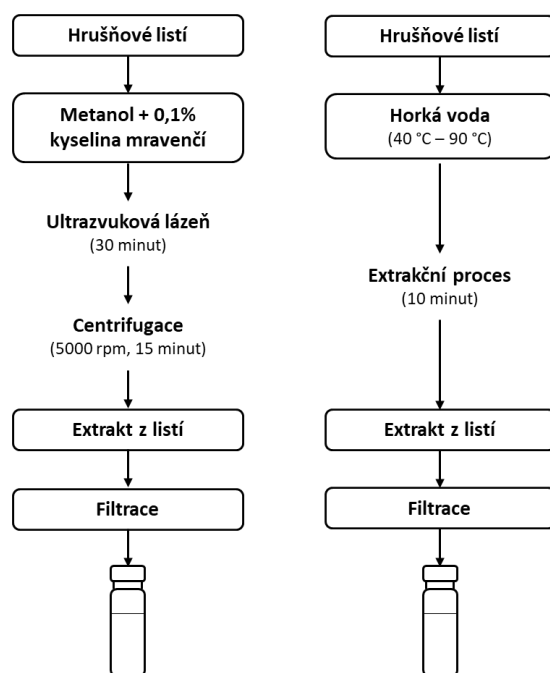
Použitý rostlinný materiál z ovocných stromů - listí, kůra, pupeny, květy a štěpka (obrázek 3) byl usušen při pokojové teplotě. Listí bylo důkladně zhomogenizované pomocí mixeru nebo v třecí misce a byly odstraněny přebytečné nezhomogenizované části (řapík). Ostatní vzorky byly homogenizovány ve třecí misce. Kůra byla získána sloupnutím vrchní části větvíček jednoletých obrostů. Po důkladné homogenizaci bylo na analytických váhách naváženo 0,05 g materiálu do 2 mL centrifugační zkumavky. Následně byla provedena extrakce pomocí 2 mL metanolu s přídavkem 0,1% (v/v) 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 μm polytetrafluorethylenový (PTFE) stříkačkový filtr do vialky. Extrakt byl do doby analýzy skladován v lednici při 4 °C.



Obrázek 3: Stanovovaný materiál. (A) – listí, (B) – kůra a pupeny, (C) – květy, (D) – štěpka.

Zdroj: autor

U hrušňového listí byla také vyzkoušena extrakce horkou vodou namísto metanolu. Usušený vzorek byl rozemlet na jemný prášek v třecí misce. Pět gramů vzorku bylo naváženo do 50ml centrifugační zkumavky a bylo přidáno 50 ml vody o teplotě od 40 °C do 90 °C. Centrifugační zkumavka byla ručně protřepána a umístěna do kádinky naplněné vodou o dané teplotě a po 10 minutách byla znovu protřepána. Přibližně 2 ml extraktu byly přeneseny plastovou injekční stříkačkou a přefiltrovány přes 0,22 μm PTFE membránový filtr do 1,5 ml vialky a ihned analyzovány. Postup vyobrazující extrakci pomocí horké vody a konvenční postup pomocí metanolu je znázorněn na obrázku 4.



Obrázek 4: Schéma postupu dvou metod použitých k přípravě extraktů z listí.

Zdroj: autor

4.3.1. Antimikrobiální aktivita hrušňového listí

Antimikrobiální aktivita byla zjišťována ve spolupráci s Centrem biologické ochrany Těchonín. Aktivita extraktů z listí hrušní byla zjišťována proti následujícím kmenům: *Candida albicans* (ATCC 90028), *Escherichia coli* (ATCC 11775), *Francisella tularensis* (Live vaccine strain, LVS), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella enterica* (ATCC 49222) a *Staphylococcus aureus* (ATCC 10832).

Aktivita byla stanovena diskovou difúzní metodou na krevním agaru (Lab Media Servis, s.r.o., Jaroměř, Česká republika). U *Candida albicans* byl použit Sabouradův agar (Lab Media Servis, s.r.o., Jaroměř, Česká republika) a u *Francisella tularensis* McLeod agar (Lab Media Servis, s.r.o., Jaroměř, Česká republika). Standardní disky byly asepticky umístěny na agarové plotny obsahující suspenzi bakterií nebo kvasinek. Poté bylo na disky umístěno 20 µl extraktu. Jako pozitivní kontroly byly použity antibiotika: ampicilin (10 µg), tetracyklin (30 µg), trimethoprim/sulfamethoxazol (Kotrimoxazol) (25 µg), tiperacillin/tazobaktam (110 µg) a vankomycin (30 µg). Krevní a McLeod agary byly inkubovány při 37 °C, Sabouradův agar při 30 °C po dobu 24 hodin, 48 hodin a 72 hodin. Pro interpretaci byly využity průměry zón, které byly měřeny s přesností na milimetry posuvným měřítkem.

4.4. HPLC metoda stanovení fenolických látek z jabloně

4.4.1. Přístroje a podmínky separace

Tabulka 4: Chromatografický systém a podmínky separace.

Chromatograf	Shimadzu LC-10
Pumpy	LC-10AD VP
Degasser	DGU-14 A
Autosampler	SIL-HTA
Termostat kolony	CTO-10A VP
Detektor, použité vlnové délky	DAD detektor SPM-M10A VP; 280, 327, 354 nm
Chromatografický systém	LC Solution
Mobilní fáze	Acetonitril/ultračistá voda + 0,1% kyselina fosforečná (pH = 2,2)
Průtok	1,0 ml/min
Gradient	Testovány různé podmínky
Teplota	30 – 60 °C
Dávkování vzorku	1 µl
Testované kolony	1. YMC Triart C18 ExRS (150 × 4,6 mm, velikost částic 5 µm) 2. YMC Triart PFP plus (150 × 4,6 mm, velikost částic 5 µm) 3. YMC Triart C18 (150 × 4,6 mm, velikost částic 5 µm) 4. Discovery® HS C18 (150 × 4,6 mm, velikost částic 5 µm) 5. Luna Omega Polar C18 (150 × 4,6 mm, velikost částic 5 µm) 6. Ascentis Express RP amid (150 × 4,6 mm, vel. částic 2,7 µm) 7. Kinetex® F5 100A (150 × 4,6 mm, velikost částic 2,6 µm) 8. Kinetex® C18 100A (150 × 4,6 mm, velikost částic 2,6 µm) 9. Kinetex® 100A Biphenyl (150 × 4,6 mm, velikost částic 5 µm)

4.4.2. Příprava směsného roztoku standardů pro vývoj metody

Nejprve byly připraveny zásobní roztoky jednotlivých standardů (floridzin, floretin, kyselina chlorogenová, kvercitrin, rutin) o koncentraci 0,5 mg/ml rozpuštěné v 1 ml metanolu (100 v/v). Směsný roztok standardů byl připraven smícháním 50 µl floridzinu, 25 µl zbývajících standardů a přidáním 350 µl metanolu. Koncentrace floridzinu ve směsi byla 500 mg/l a zbývajících standardů 25 mg/l. Tento směsný roztok byl použit pro vývoj metody HPLC a optimalizaci podmínek separace. Všechny roztoky byly až do použití skladovány při 4 °C v chladničce.

4.4.3. Validace metody

Validace byla provedena dle pokynů ICH [88].

Pro stanovení linearit byl připraven směsný roztok standardů o koncentraci 2, 20, 50, 100, 150, 200, 250 mg/l (florethin, rutin, kyselina chlorogenová, kvercitrin) a 2000, 4000, 6000, 8000 mg/l (floridzin). Opakovatelnost byla provedena za použití směsného roztoku standardů v hladinách 20, 100, 250 mg/l (florethin, rutin, kyselina chlorogenová, kvercitrin) a 1000, 4000, 8000 mg/l (floridzin).

Výtěžnost extrakčního postupu byla provedena pomocí osmi roztoků vzorku. 6 roztoků bylo připraveno se známým množstvím přídavku standardů a 2 roztoky bez přídavku standardů. Všechny tyto vzorky byly extrahovány stejným postupem, jak je popsáno v kapitole 4.3. U každého vzorku byly provedeny tři nástřiky na kolonu. Z nástřiků byl získán průměr ploch, který se přepočítal na jednotnou navážku 0,05 g. Výtěžnost (R) byla vypočtena dle rovnice:

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

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

A_{VZ}...plocha píků vzorku

A_{ST}...plocha píků standardu

Přesnost byla provedena s osmi roztoky vzorků (kapitola 4.3.). U každého vzorku byly provedeny 3 nástřiky na kolonu.

4.5. HPLC metoda pro stanovení fenolických látek z hrušně

4.5.1. Přístroje a podmínky separace

Tabulka 5: Chromatografický systém a podmínky separace.

Chromatograf	Shimadzu LC-10
Pumpy	LC-10AD VP
Degasser	DGU-14 A
Autosampler	SIL-HTA
Termostat kolony	CTO-10A VP
Detektor, použité vlnové délky	DAD detektor SPM-M10A VP; 220, 327, 354 nm
Chromatografický systém	LC Solution
Mobilní fáze	Acetonitril (A)/ultračistá voda + 0,1% kyselina fosforečná (pH = 2,2) (B)
Průtok	1,0 ml/min
Gradient	0,0 – 8,0 min 10 – 55% (A), 8,0 – 8,2 min 55 – 90% (A), 8,2 – 10,2 min 90% (A), 10,2 – 10,5 min 90 – 0% (A)
Teplota	30 °C
Dávkování vzorku	1 µl
Testované kolony	1. Ascentis Express RP amid (150 × 4,6 mm, vel. částic 2,7 µm) 2. Ascentis Express RP amid (150 × 4,6, velikost částic 5 µm). 3. Kinetex® F5 100A (150 × 4,6 mm, velikost částic 2,6 µm) 4. YMC Triart C18 ExRS (150 × 4,6 mm, velikost částic 5 µm)

4.5.2. Příprava směsného roztoku standardů pro vývoj metody

Nejprve byly připraveny zásobní roztoky jednotlivých standardů (arbutin, kyselina chlorogenová, kyselina 1,5-dikafeoylchinová, kyselina 3,5-dikafeoylchinová, rutin) o koncentraci 0,5 mg/ml rozpuštěné v 1 ml metanolu (100 v/v). Směsný roztok standardů byl připraven smícháním 100 µl všech standardů do jedné vialky. Koncentrace jednotlivých standardů ve směsi byla 100 mg/l. Všechny roztoky byly až do použití skladovány při 4 °C v chladničce.

4.5.3. Validace metody

Stejně jako u předchozí metody byla validace provedena dle pokynů ICH [88].

Pro stanovení linearitu byl připraven směsný roztok standardů o koncentraci 2,5, 20, 50, 100, 150, 200, 250 mg/l (rutin, kyselina 3,5-dikafeoylchinová a 1,5-dikafeoylchinová) a 100, 250, 500, 750, 1000, 1250 mg/l (arbutin, kyselina chlorogenová). Opakovatelnost byla provedena za použití směsného roztoku standardů v hladinách 20, 100, 250 mg/l (rutin, kyselina 3,5-dikafeoylchinová a 1,5-dikafeoylchinová) a 100, 500, 1000 mg/l (arbutin, kyselina chlorogenová).

Výtěžnost extrakčního postupu byla provedena pomocí osmi roztoků vzorku. Šest roztoků bylo připraveno se známým množstvím přídatku standardů a 2 roztoky bez přídatku standardů. Všechny tyto vzorky byly extrahovány stejným postupem, jak je popsáno v kapitole 4.3. U každého vzorku byly provedeny tři nástřiky na kolonu. Z nástřiků byl získán průměr ploch, který se přepočítal na jednotnou navážku 0,05 g. Výtěžnost (R) byla vypočtena dle rovnice:

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

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

A_{VZ}...plocha píků vzorku

A_{ST}...plocha píků standardu

Přesnost byla provedena se šesti roztoky vzorků (kapitola 4.3.). U každého vzorku byly provedeny 3 nástřiky na kolonu.

4.6. Stanovení obsahu fenolických látek

Pro stanovení obsahu fenolických látek v rostlinném materiálu jabloní a hrušní byla použita metoda vnějšího standardu. Identifikace píku byla dosažena porovnáním jejich UV spekter a retenčních časů s referenčními standardními roztoky. U každého vzorku byly provedeny tři nástřiky na kolonu, ze kterých byla stanovena průměrná hodnota plochy píku. Kvantitativní vyhodnocení píků bylo vypočteno pomocí následujícího vzorce:

$$c_x = \frac{A_x}{A_{ST}} * c_{ST}$$

A_x...průměrná plocha píku analytu

A_{ST}...průměrná plocha píku standardu

c_x...koncentrace analytu

c_{ST}...koncentrace standardu

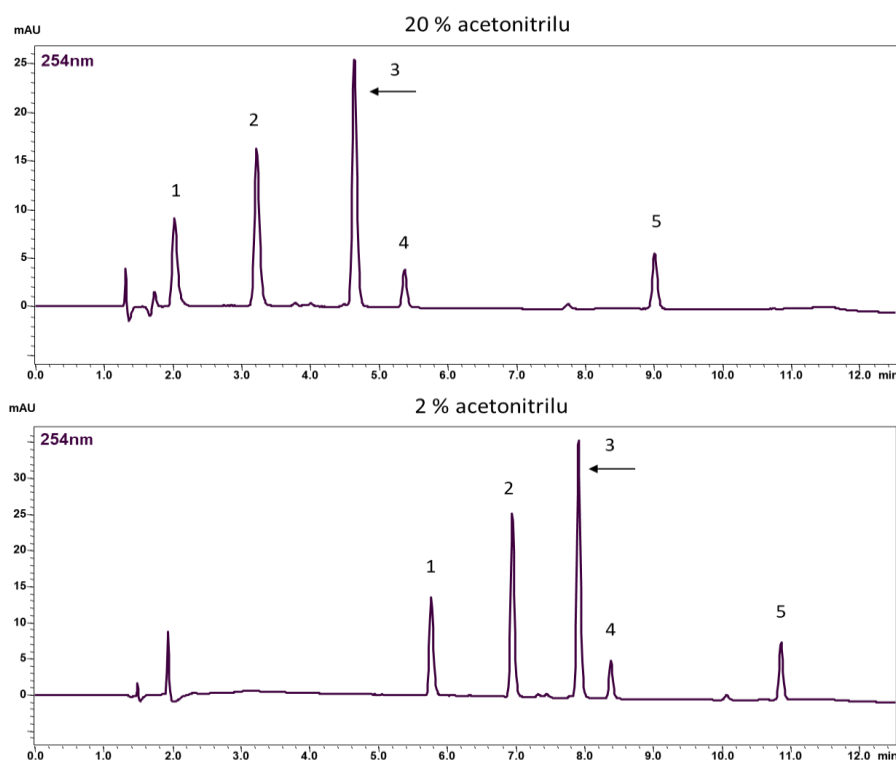
Výsledná koncentrace analytů byla převedena na množství použitého extrakčního rozpouštědla (2 ml metanolu s 0,1% kyselinou mravenčí) a následně převedena na skutečnou hmotnost vzorku s korekcí na čistotu použitého standardu (kapitola 4.2.). Celkové množství jednotlivých fenolických sloučenin bylo vyjádřeno v mg/g sušené hmotnosti rostlinného materiálu.

U metody pro stanovení fenolických látek v jabloni byly použity vlnové délky 280 nm (floridzin a floretin), 327 nm (kyselina chlorogenová) a 354 nm (rutin a kvercitrin). U metody pro hrušeň byly aplikovány vlnové délky o 220 nm (arbutin), 327 nm (kyselina chlorogenová a její deriváty) a 354 nm (rutin).

5. VÝSLEDKY

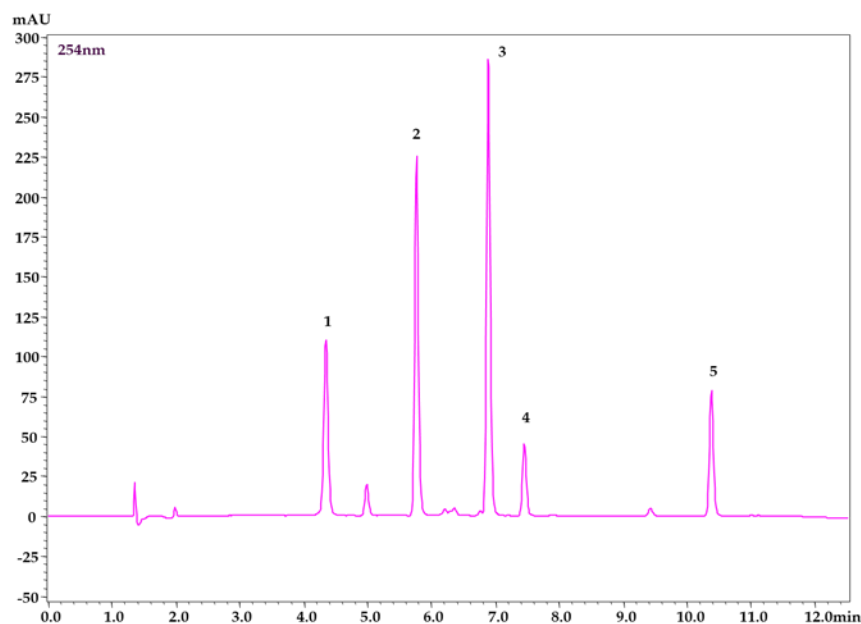
5.1. Optimalizace chromatografické metody a volba kolony pro analýzu materiálu z jabloně

Optimalizace separace byla provedena pomocí mobilní fáze složené z acetonitrilu a vodného roztoku 0,1% kyseliny fosforečné (pH = 2,2) s průtokem 1 ml/min. Ke krátké optimalizaci byla použita kolona YMC Triart C18 ExRS (150 × 4,6 mm, velikost částic 5 μm). Nejprve byla testována koncentrace acetonitrilu na začátku gradientové eluce v rozmezí 2 – 20 %. Nízký obsah acetonitrilu prodlužoval dobu analýzy a vyšší obsah způsobil koeluci kyseliny chlorogenové s mrtvým objemem (obrázek 5). Zvolená počáteční koncentrace acetonitrilu byla proto 10 %, která byla také použita pro screening testovaných kolon. Rovněž byla optimalizována teplota kolonového prostoru v rozsahu 30 °C – 60 °C. Vyšší teplota (60 °C) nepatrně snížila retenci floretinu, ale z důvodu tepelné stability stacionární fáze na bázi oxidu křemičitého nebyla použita. Pro separaci byla využita teplota 30 °C. Konečné podmínky separace jsou sepsány v kapitole 4.4.1.

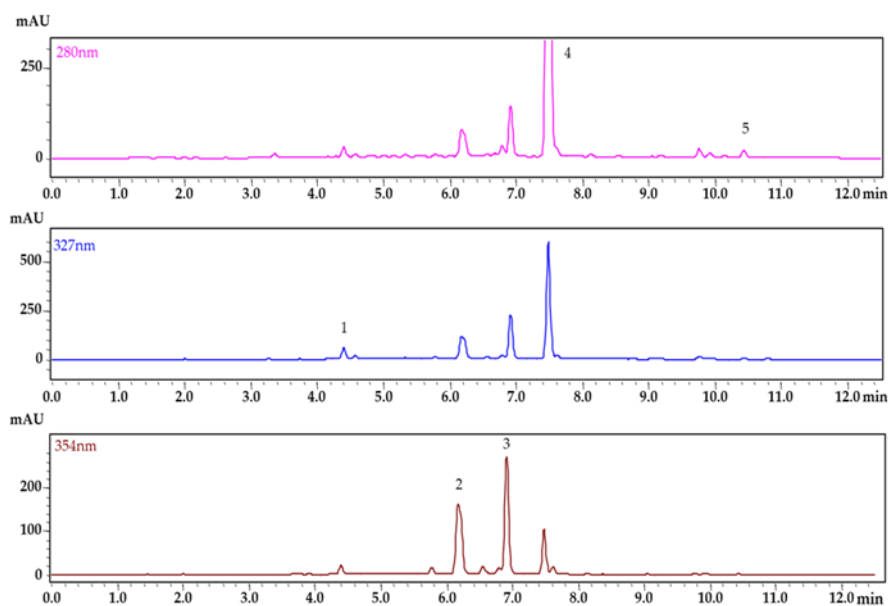


Obrázek 5: Separace analytů při změně koncentrace acetonitrilu na počátku gradientu. (1) kyselina chlorogenová, (2) rutin, (3) kvercitrin, (4) floridzin, (5) floretin.

V rámci výběru kolony byla kriticky hodnocena symetrie píku (A_R), rozlišení (R_S), retenční časy (t_R) všech analytů a kapacita píku (P_c). Testované kolony jsou uvedeny v kapitole 4.4.1. Kolony YMC Triart C18 (100 × 4,6 mm, velikost částic 5 μm) a YMC Triart PFP plus (150 × 4,6 mm, velikost částic 5 μm) vykazovaly nízké rozlišení píku floridzinu a kvercitrinu ($R_S = 2,90$ a $1,68$). Discovery® HS C18 (150 × 4,6 mm, velikost částic 5 μm) vykazoval špatnou symetrii píku floridzinu ($A_R = 1,65$) a floretinu ($A_R = 1,76$). Velmi dobré rozlišení, selektivita a symetrie píku však byly pozorovány u core-shell kolon, Kinetex 100A Bifenyl (150 × 4,6 mm, velikost částic 5 μm) a Kinetex® C18 100A (150 × 4,6 mm, 2,6 μm velikost částic). Tyto kolony spolu s Ascentis Express RP amid (150 × 4,6 mm, velikost částic 2,7 μm) generovaly vyšší zpětný tlak blízko maximálního pracovního rozsahu LC přístroje. Kinetex® F5 100A (150 × 4,6 mm, velikost částic 2,6 μm) poskytl horší rozlišení kyseliny chlorogenové ($R_S = 1,35$) s vrcholem neznámého píku. YMC Triart C18 ExRS (150 × 4,6 mm, velikost částic 5 μm) a Luna Omega Polar C18 (150 × 4,6 mm, velikost částic 5 μm) měly podobnou účinnost, avšak při použití druhé zmíněné kolony byla pozorována delší doba analýzy. Na testovaných kolonách probíhaly separace fenolických sloučenin v následujícím pořadí: (1) kyselina chlorogenová, (2) rutin, (3) kvercitrin, (4) floridzin a (5) floretin, kromě kolony Ascentis Express RP amid (150 × 4,6 mm, velikost částic 2,7 μm), na které byla pozorována změna retence pořadí kvercitrinu a floridzinu. Nakonec byla pro analýzu rostlinného materiálu použita analytická kolona YMC Triart C18 ExRS (150 × 4,6 mm, velikost částic 5 μm) z důvodu krátké doby analýzy, dostatečného rozlišení a symetrie píků. Tato kolona byla využita pro validaci metody a následnou analýzu rostlinných extraktů. Podmínky separace všech testovaných kolon jsou důkladně shrnuty v příloze. Separace směsi standardů za optimalizovaných a validovaných podmínek na analytické koloně YMC Triart C18 ExRS je znázorněna na obrázku 6 a reálný extrakt je vyobrazen na obrázku 7.



Obrázek 6: Chromatogram směsného roztoku standardů na koloně YMC Triart C18 ExRS (150 × 4,6 mm, velikost částic 5 μm). (1) kyselina chlorogenová, (2) rutin, (3) kvercitrin, (4) floridzin, (5) floretin.



Obrázek 7: Chromatogram fenolických sloučenin z extraktu z kůry jabloní. (1) kyselina chlorogenová, (2) rutin, (3) kvercitrin, (4) floridzin, (5) floretin.

5.2. Optimalizace extrakčního postupu – jablň

Kritickým faktorem extrakčního postupu byla výtěžnost zjišťovaných fenolických látek z rostlinného materiálu. Nejprve byla provedena extrakce 0,1 g suchého rostlinného nahrubo homogenizovaného materiálu za použití 1 ml methanolu s 0,1% kyselinou mravenčí (99,9 : 0,1,

(v/v)). Byla zjištěna dostatečná výtěžnost fenolických látek a horší opakovatelnost v důsledku nesprávné homogenizace pomocí mixéru NutriBullet. Z tohoto důvodu byla použita třecí miska k důkladné homogenizaci suchého materiálu na jemný prášek. Tento postup zlepšil opakovatelnost extrakčního postupu. V dalším optimalizačním kroku byl objem extrakčního rozpouštědla zvýšen z 1 ml na 2 ml a současně bylo sníženo množství sušiny z 0,1 g na 0,05 g, což vedlo k uspokojivým hodnotám výtěžnosti. Tento postup byl použit pro následnou validaci metody. Další zvyšování objemu extrakčního rozpouštědla vedlo k zředení minoritních fenolických sloučenin (kyselina chlorogenová, floretin) a tím došlo ke snížení signálu. Z tohoto důvodu byl nakonec použit objem 2 ml rozpouštědla.

5.3. Validační parametry HPLC metody pro analýzu materiálu z jabloní

5.3.1. Test vhodnosti chromatografického systému

Test vhodnosti chromatografického systému zahrnuje hodnocení opakovatelnosti retenčního času (t_R), faktoru symetrie chromatografických píků (A_S), rozlišení chromatografických píků (R_S) a separační kapacity.

Tabulka 6: Test vhodnosti chromatografického systému s použitím kolony YMC Triart C18 ExRS (150 × 4,6 mm, velikost částic 5 μm).

Analyt	t_R^a	A_S^b	R_S^c	P_C^d
Kyselina chlorogenová	4,48	1,15	21,20	31
Rutin	6,25	1,25	10,58	38
Kvercitrin	6,90	1,23	8,82	37
Floridzin	7,55	1,19	4,34	40
Floretin	10,52	1,19	22,23	37

K hodnocení se využil pracovní roztok pro kalibraci o koncentraci 50 mg/l.

^a Retenční čas, ^b symetrie píku, ^c rozlišení píků, ^d píková kapacita (počítaná s gradientovou elucí, 12,51 minut).

Dle FDA by mělo být rozlišení píků > 2 a symetrie píků ≤ 2 [74]. Tyto parametry byly splněny.

5.3.2. Validační parametry - jabloň

Tabulka 7: Výsledné validační parametry metody analýzy fenolických látek s použitím kolony YMC Triart C18 ExRS (150 × 4,6 mm, velikost částic 5 μm).

Analyt	(r ²) ^a	Kalibrační rozsah (mg/l)	Výtěžnost (%)	Přesnost (RSD, %)	Opakovatelnost (RSD, %)
Kyselina chlorogenová	0,997	2 – 250	123,74	2,40	1,37; 0,72; 1,59 ^b
Rutin	0,998	2 – 250	97,25	4,21	0,46; 0,91; 1,67 ^b
Kvercitrin	0,996	2 – 250	86,54	3,23	1,16; 0,90; 1,75 ^b
Floridzin	0,994	1000 – 8000	88,74	2,07	0,34; 0,51; 0,76 ^d
Floretin	0,998	2 – 250	90,44	4,56	0,47; 0,68; 1,62 ^c

^a korelační koeficient, ^b koncentrace 20, 100, 250 mg/l, ^c koncentrace 1000, 4000, 8000 mg/l.

Výsledné validační parametry byly součástí diplomové práce autorky [89].

5.4. Sledování fenolického profilu v průběhu vegetace – jabloň

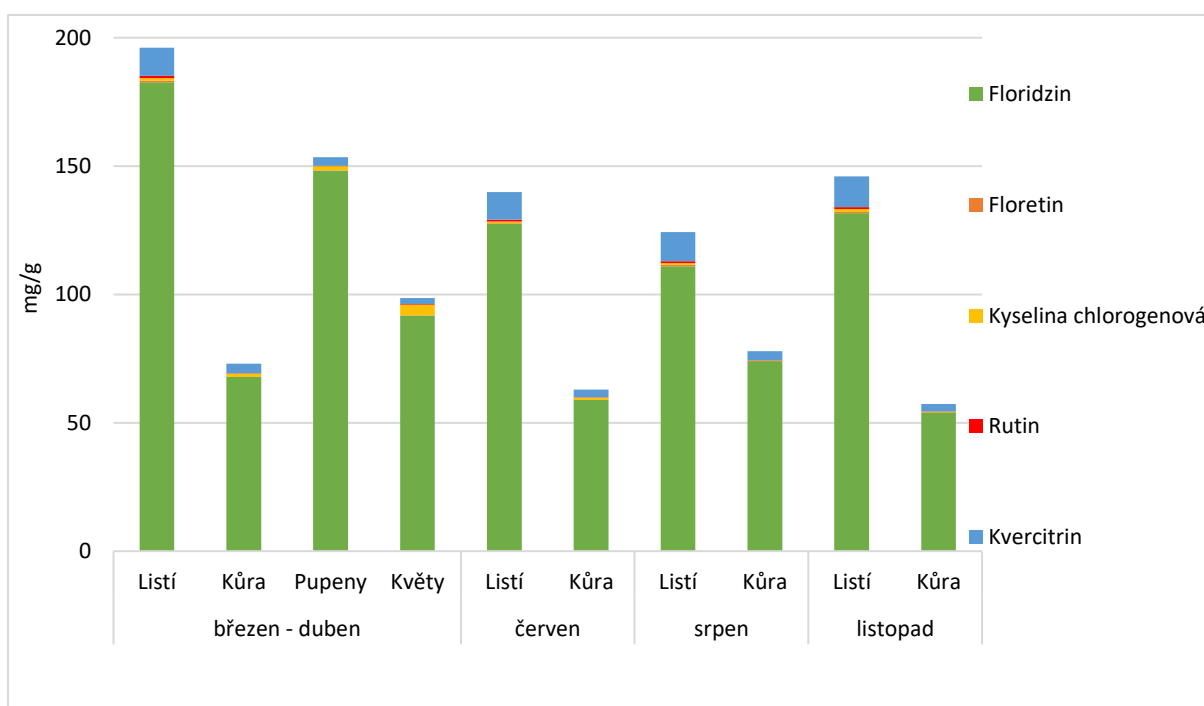
V rámci disertační práce byl sledován profil výskytu fenolických látek v materiálu z jabloní během 4 period vegetačního období u jednotlivých odrůd, které jsou dále uvedeny detailně v tabulkách. Obsah fenolických látek je vyjádřen v mg/g sušiny listí, kůry, pupenů, a květů.

5.4.1. Odrůda 'Topaz'

Tabulka 8: Obsah fenolických látek odrůdě 'Topaz' v mg/g.

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

Graf 5: Obsah fenolických látek v odrůdě 'Topaz' v mg/g.

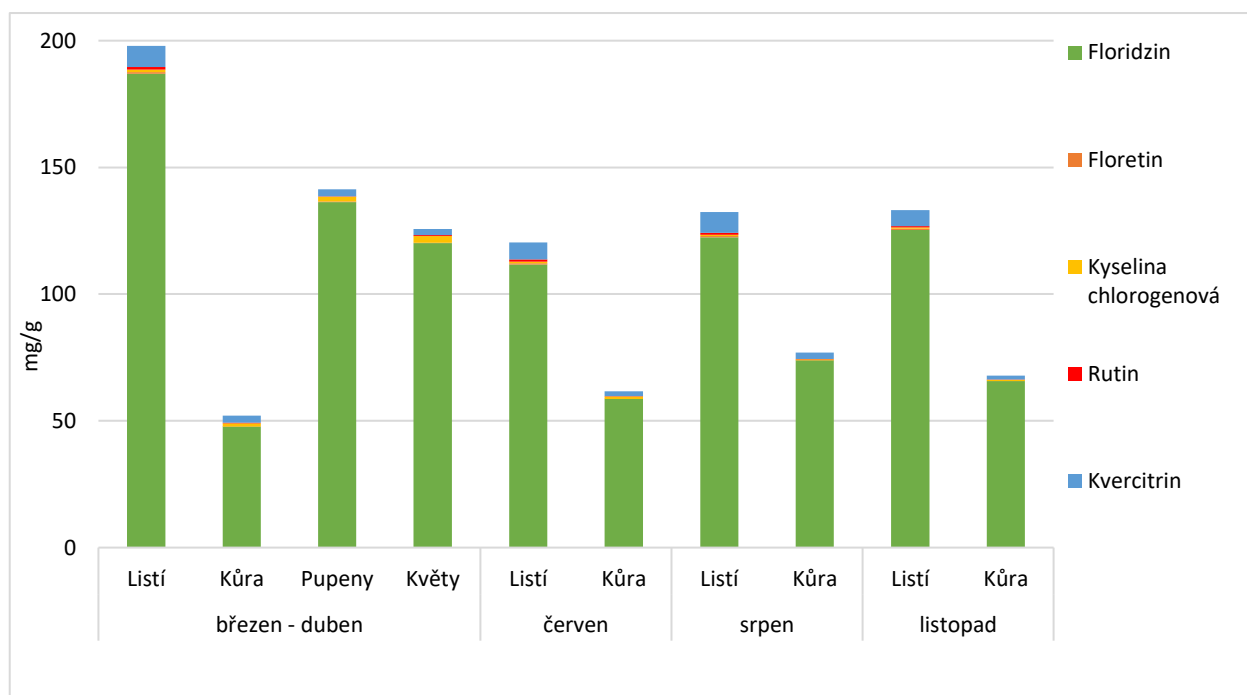


5.4.2. Odrůda 'Golden Delicious'

Tabulka 9: Obsah fenolických látek v odrůdě 'Golden Delicious' v mg/g.

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

Graf 6: Obsah fenolických látek v odrůdě 'Golden Delicious' v mg/g.

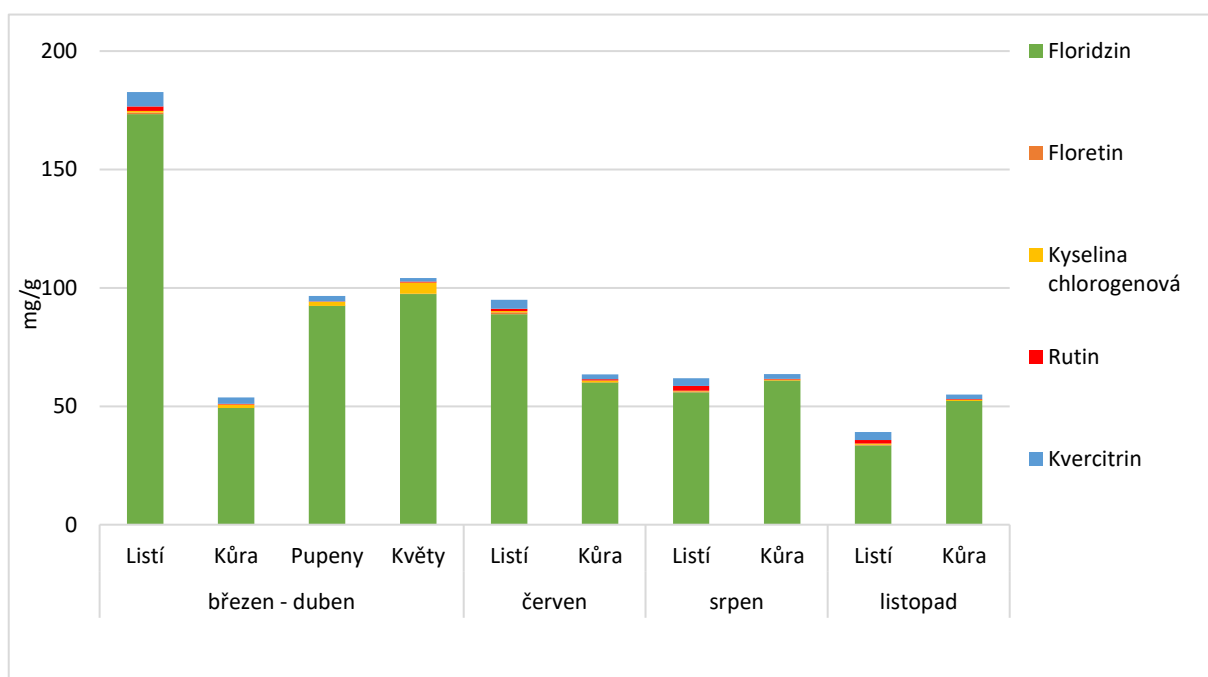


5.4.3. Odrůda 'Angold'

Tabulka 10: Obsah fenolických látek v odrůdě 'Angold' v mg/g.

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

Graf 7: Obsah fenolických látek v odrůdě 'Angold' v mg/g.

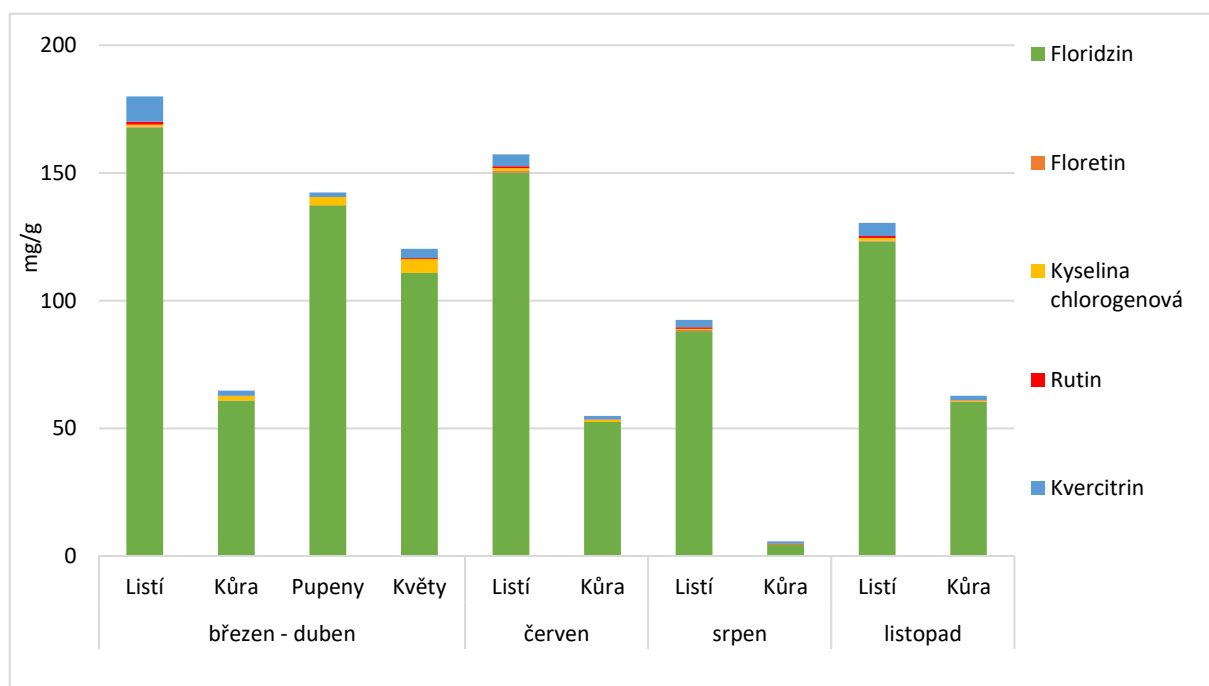


5.4.4. Odrůda 'Meteor'

Tabulka 11: Obsah fenolických látek v odrůdě 'Meteor' v mg/g.

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

Graf 8: Obsah fenolických látek v odrůdě 'Meteor' v mg/g.

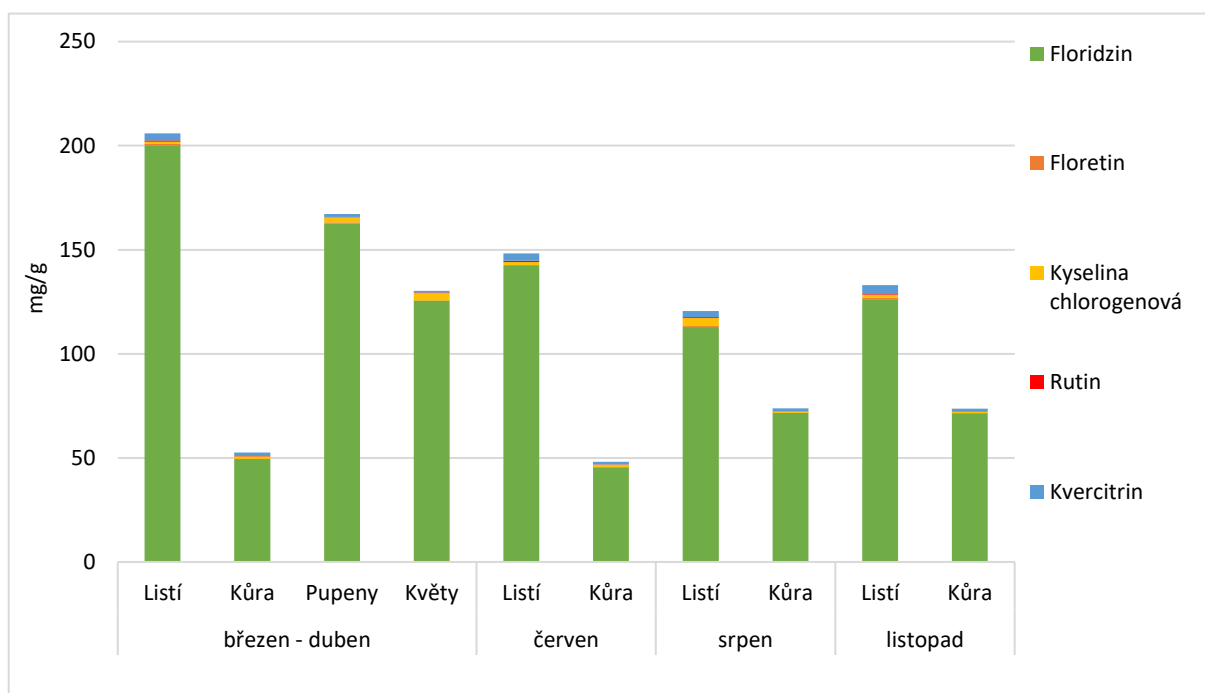


5.4.5. Odrůda 'Melrose'

Tabulka 12: Obsah fenolických látek v odrůdě 'Melrose' v mg/g.

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

Graf 9: Obsah fenolických látek v odrůdě 'Melrose' v mg/g.

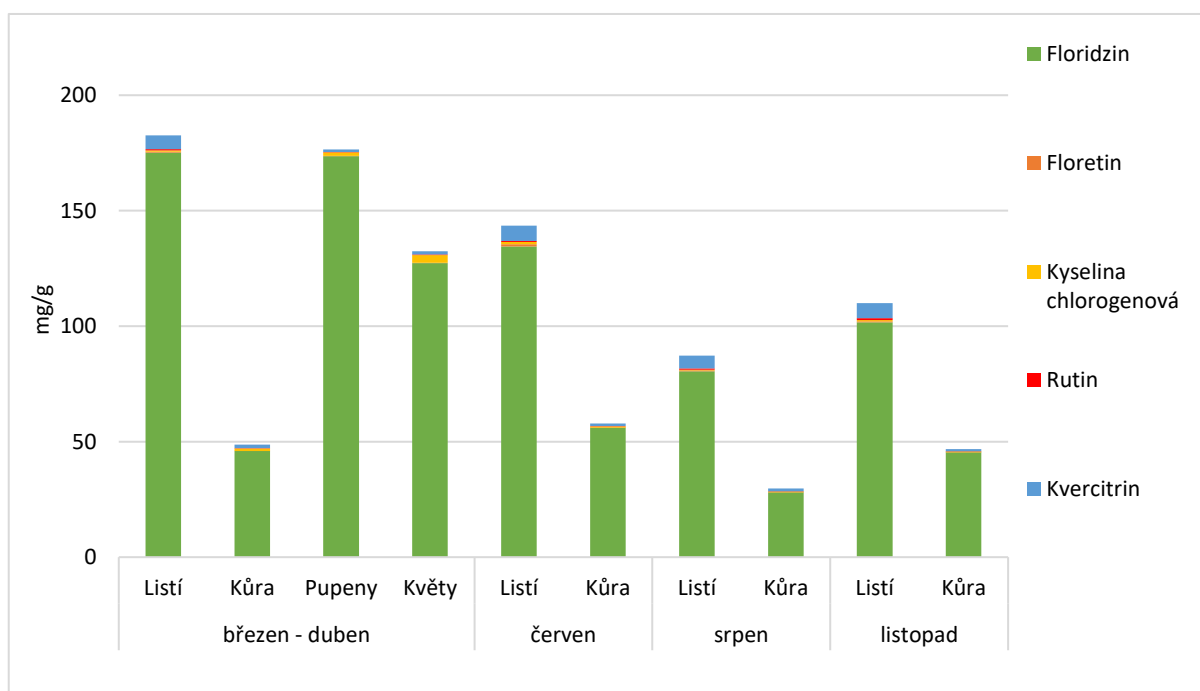


5.4.6. Odrůda 'Fuji'

Tabulka 13: Obsah fenolických látek v odrůdě 'Fuji' v mg/g.

'Fuji'	Březen – duben 2020				Červen 2020		Srpen 2020		Listopad 2020	
	Listí	Kůra	Pupeny	Květy	Listí	Kůra	Listí	Kůra	Listí	Kůra
Floridzin	175,13	45,96	173,63	127,36	134,57	56,06	80,49	28,09	101,65	45,45
Floretin	0,46	0,01	0,08	0,06	0,94	0,01	0,33	0,01	0,43	0,01
Kyselina chlorogenová	0,57	1,09	1,52	3,36	0,92	0,53	0,34	0,35	0,61	0,3
Rutin	0,53	0,19	0,13	0,26	0,42	0,15	0,57	0,07	0,76	0,1
Kvercitrin	5,88	1,51	1,09	1,39	6,71	1,15	5,53	1,24	6,56	0,94
Celkem	182,57	48,76	176,45	132,43	143,56	57,9	87,26	29,76	110,01	46,8

Graf 10: Obsah fenolických látek v odrůdě 'Fuji' v mg/g.

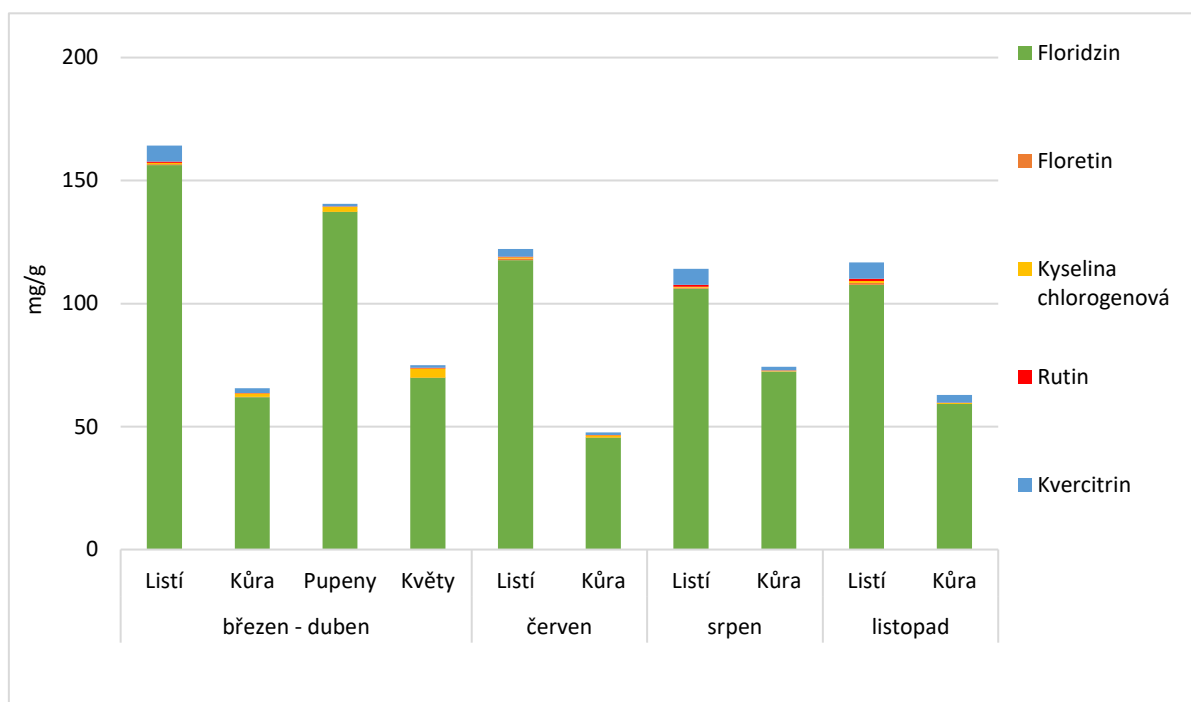


5.4.7. Odrůda 'Braeburn'

Tabulka 14: Obsah fenolických látek v odrůdě 'Braeburn' v mg/g.

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

Graf 11: Obsah fenolických látek v odrůdě 'Braeburn' v mg/g.

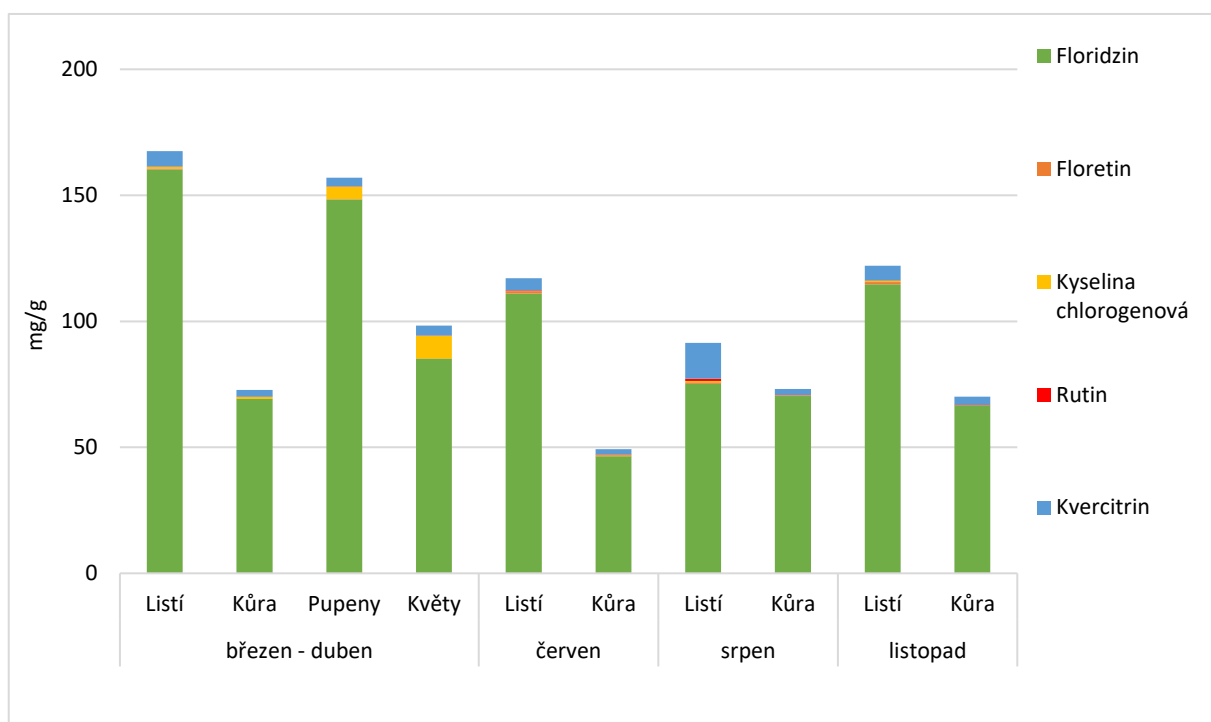


5.4.8. Odrůda 'Lady Silvia'

Tabulka 15: Obsah fenolických látek v odrůdě 'Lady Silvia' v mg/g.

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

Graf 12: Obsah fenolických látek v odrůdě 'Lady Silvia' v mg/g.

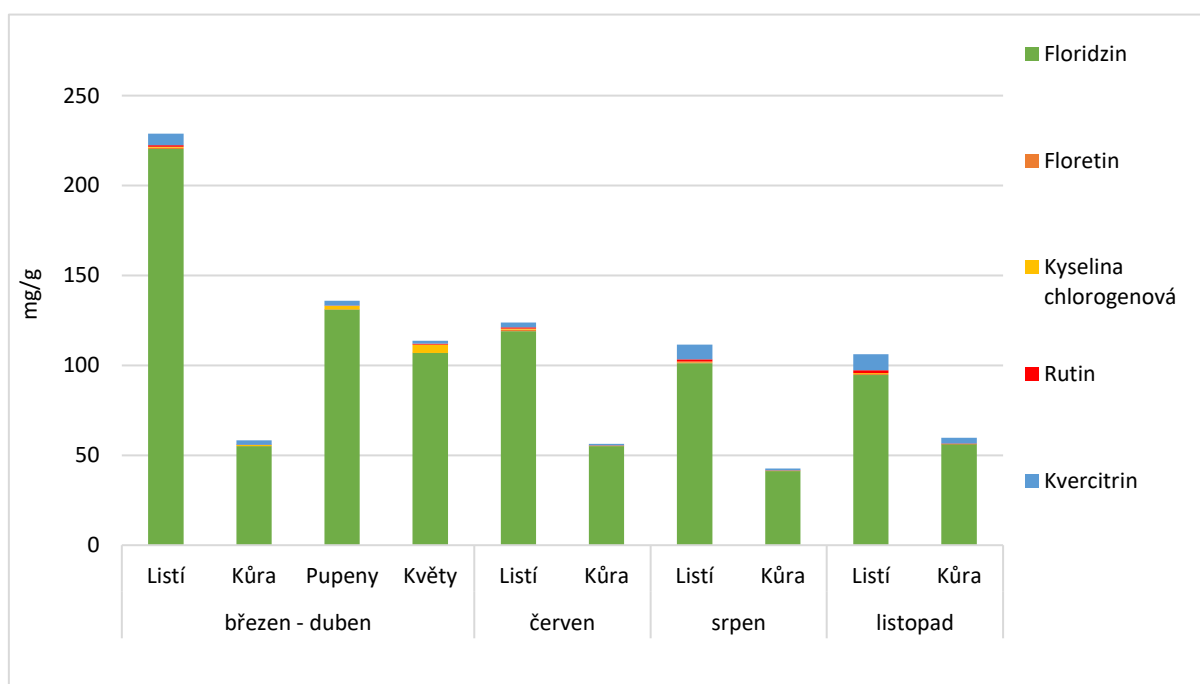


5.4.9. Odrůda 'Rubinstep'

Tabulka 16: Obsah fenolických látek v odrůdě 'Rubinstep' v mg/g.

'Rubinstep'	Březen – duben 2020				Červen 2020		Srpen 2020		Listopad 2020	
	Listí	Kůra	Pupeny	Květy	Listí	Kůra	Listí	Kůra	Listí	Kůra
Floridzin	220,3	55,07	131,15	106,88	119,09	55,07	101,28	41,25	94,67	56,12
Floretin	0,64	0,01	0,03	0,03	0,8	0,02	0,47	0,01	0,46	0
Kyselina chlorogenová	0,69	0,66	1,91	4,72	0,61	0,25	0,44	0,21	0,64	0,05
Rutin	0,82	0,14	0,09	0,45	0,7	0,09	1,1	0,07	1,57	0,32
Kvercitrin	6,4	2,48	2,67	1,6	2,71	0,94	8,33	1,17	8,8	3,33
Celkem	228,85	58,36	135,85	113,68	123,91	56,37	111,62	42,71	106,14	59,82

Graf 13: Obsah fenolických látek v odrůdě 'Rubinstep' v mg/g.

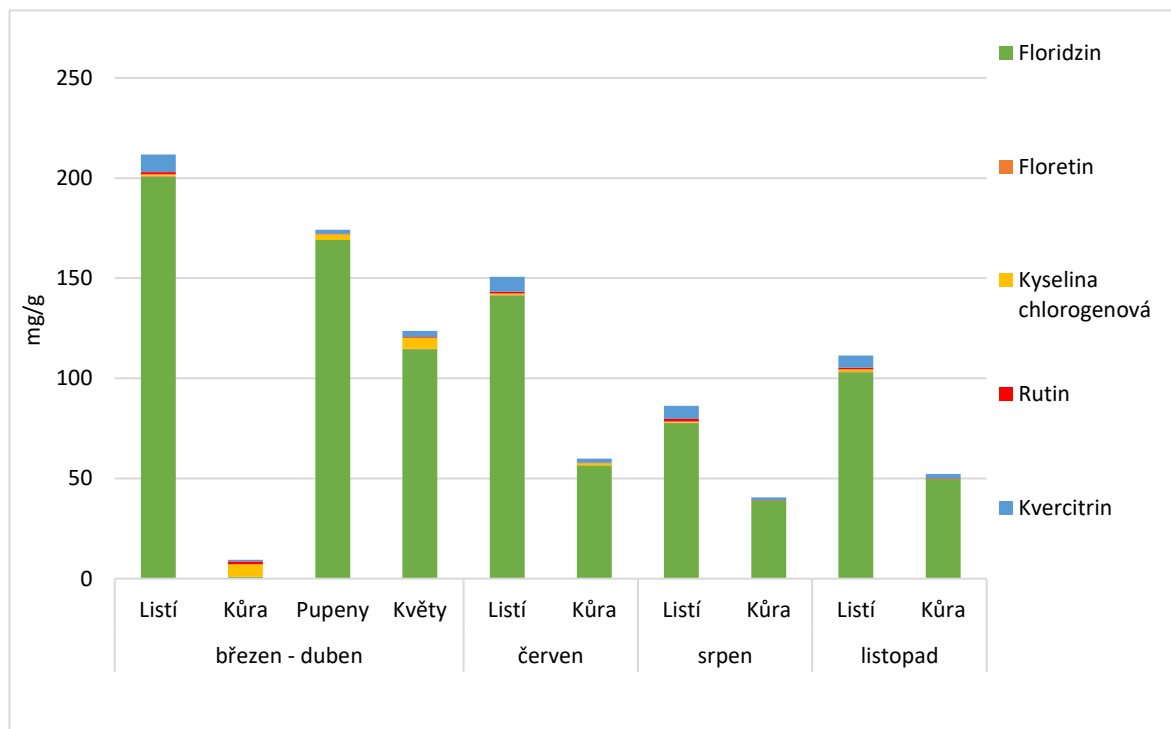


5.4.10. Odrůda 'Rubin'

Tabulka 17: Obsah fenolických látek v odrůdě 'Rubin' v mg/g.

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

Graf 14: Obsah fenolických látek v odrůdě 'Rubin' v mg/g.



5.4.11. Štěpka jabloní

Pro komplexní informace o distribuci fenolických látek v celém stromu byla analyzována i štěpka, která často zbývá při kácení či prořezávání stromů. K přípravě směšného vzorku štěpky z jabloní byly použity odrůdy 'Golden Delicious', 'Lady Silvia', 'Rubinola' a 'Angold'.

Tabulka 18: Obsah fenolických látek ve směšném vzorku štěpky jabloní v mg/g.

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

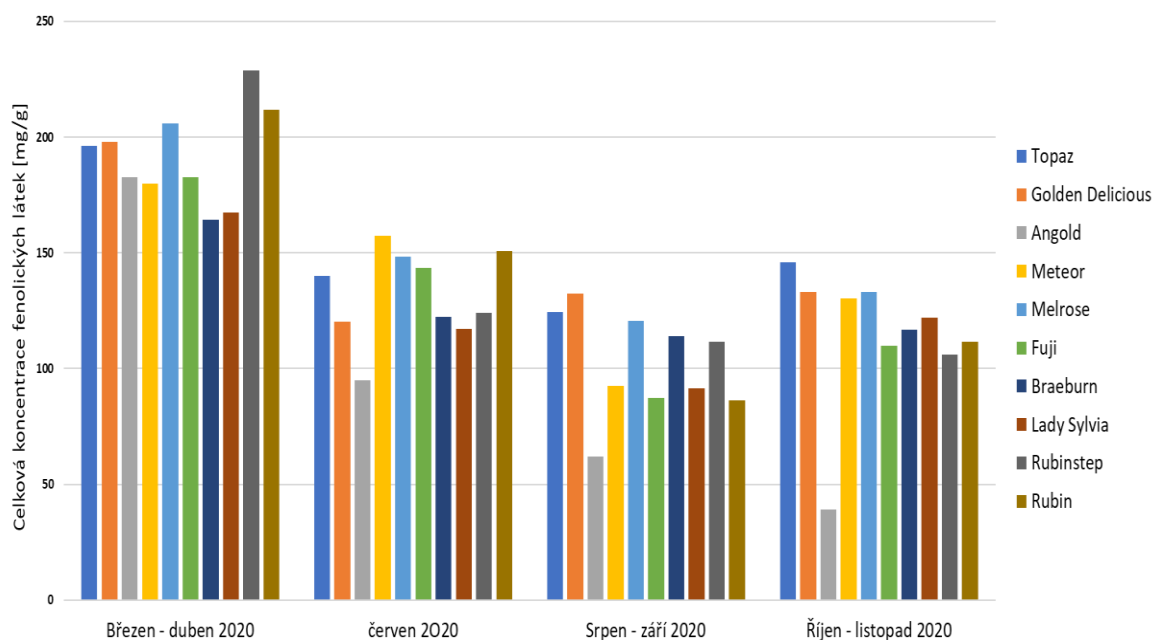
Výsledky ze sledování vegetačního období a štěpky byly součástí diplomové práce [90].

5.4.12. Souhrn výsledků – jabloň

Vzorky z 10-ti odrůd jabloní byly odebírány 4krát za rok. V jarním období (březen – duben) byla celková suma fenolických látek 164,25 mg/g DW ('Braeburn') – 228,85 mg/g DW ('Rubinstep') v listech, 48,76 mg/g DW ('Fuji') – 73,01 mg/g DW ('Topaz') v kůře, 96,57 mg/g DW ('Angold') – 176,45 mg/g DW ('Fuji') v pupenech a 74,91 mg/g DW ('Braeburn') – 132,43 mg/g DW ('Fuji') v květech. V červnovém odběru byla naměřena suma fenolických látek 94,93 mg/g DW ('Angold') – 157,22 mg/g DW ('Meteor') v listech, 47,62 mg/g DW ('Braeburn') – 63,53 mg/g DW ('Angold') v kůře. V letním období (srpen) byla celková suma fenolických látek 61,89 mg/g DW ('Angold') – 132,42 mg/g DW ('Golden Delicious') v listech, 29,76 mg/g DW ('Fuji') – 77,85 mg/g DW ('Topaz') v kůře. Zjištěná koncentrace fenolických látek v listopadovém odběru byla 39,18 mg/g DW ('Angold') – 145,96 mg/g DW ('Topaz') v listech, 46,81 mg/g DW ('Fuji') – 73,60 mg/g DW ('Melrose') v kůře. Štěpka obsahovala 50,73 mg/g DW.

Majoritní fenolickou látkou byl u každé odrůdy a téměř všech materiálů floridzin. Největší záchyt fenolických látek byl zaznamenán v jarním období, konkrétně v odrůdě 'Rubinstep', dále pak 'Rubín' a 'Melrose'. U těchto odrůd se obsah pohyboval nad hladinou 200 mg/g. V dalších sledovaných obdobích došlo k poklesu sumy fenolických látek zhruba o 25 % v závislosti na odrůdě. U některých odrůd, například 'Angold' byl pozorován pokles až o 80 % mezi jarním a podzimním obdobím. U odrůdy 'Rubinstep' s nejvyšším obsahem fenolických látek v jarním období došlo do podzimu k poklesu asi o 50 % obsahu těchto látek. Detailní grafický záznam sumy fenolických látek během sledování vegetačního období u jednotlivých odrůd je vyobrazen v grafu 15.

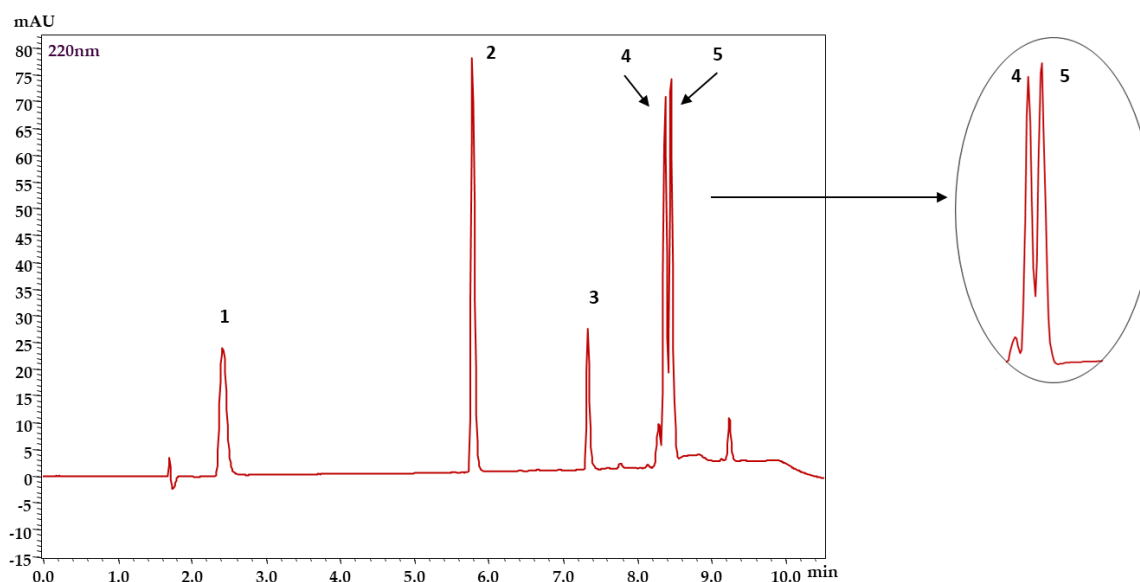
Graf 15: Graf závislosti celkového obsahu fenolických látek v listí v 10 odrůdách jabloní [mg/g] na daném období.



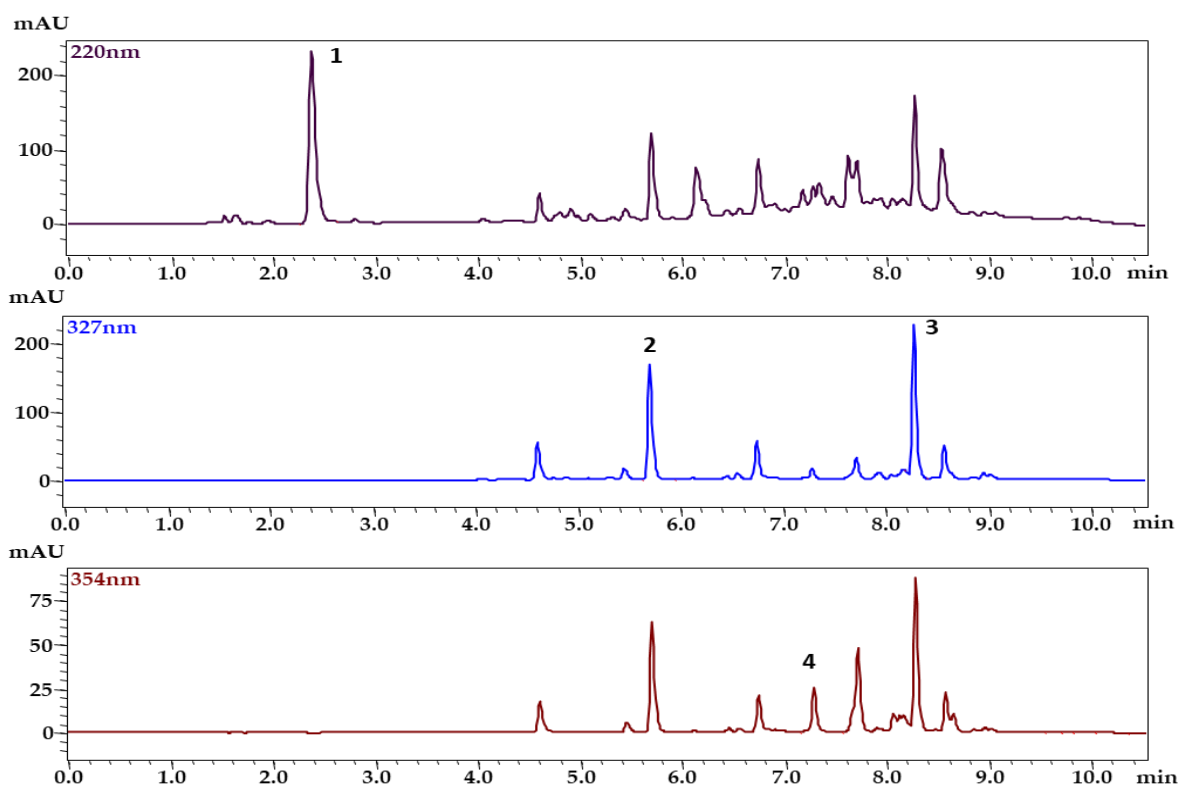
5.5. Vývoj chromatografické metody a extrakce pro analýzu materiálů z hrušně

V rámci optimalizace chromatografické metody pro separaci fenolických látek z materiálu hrušně byla testována počáteční koncentrace acetonitrilu (2 – 20 %) v gradientové eluci a teplota kolonového prostoru (30 °C – 60 °C) stejně jako v metodě pro analýzu materiálu jabloní. I zde jsou výstupem jsou stejné výsledky, jaké jsou uvedeny v kapitole 5.1. Extrakce byla provedena stejným způsobem jako v kapitole 5.2.

Byly testovány tyto kolony: Ascentis Express RP amid (150 × 4,6, velikost částic 2,7 μm), Ascentis Express RP amid (150 × 4,6, velikost částic 5 μm). Kinetex® F5 100A (150 × 4,6 mm, velikost částic 2,6 μm) a YMC Triart C18 ExRS (150 × 4,6 mm, velikost částic 5 μm). Kritickým parametrem pro výběr kolony byla schopnost dostatečně odseparovat strukturně podobné deriváty kyseliny chlorogenové. Toho bylo dosaženo pouze na koloně Ascentis Express RP amid (150 × 4,6, velikost částic 2,7 μm). Proto byla tato kolona použita k validaci a stanovení fenolických látek v rostlinném materiálu z hrušně. Separace směsi standardů za optimalizovaných a validovaných podmínek na analytické koloně Ascentis Express RP amid (150 × 4,6, velikost částic 2,7 μm) je znázorněna na obrázku 8 a reálný extrakt je vyobrazen na obrázku 9.



Obrázek 8: Chromatogram směšného roztoku standardů na koloně Ascentis Express RP amid (150 × 4,6, velikost částic 2,7 μm). (1) arbutin, (2) kyselina chlorogenová, (3) rutin, (4) kyselina 3,5-dikafeoylchinová, (5) kyselina 1,5-dikafeoylchinová.



Obrázek 9: Chromatogram fenolických sloučenin z extraktu z listí hrušní. (1) arbutin, (2) kyselina chlorogenová, (3) kyselina 3,5-dikafeoylchinová, (4) rutin.

5.6. Validační parametry HPLC metody pro analýzu materiálu z hrušní

5.6.1. Test vhodnosti chromatografického systému

Test vhodnosti chromatografického systému zahrnuje hodnocení opakovatelnosti retenčního času (t_R), faktoru symetrie chromatografických píků (A_S), rozlišení chromatografických píků (R_S) a separační kapacity.

Tabulka 19: Test vhodnosti chromatografického systému s použitím kolony Ascentis Express RP amide (150 × 4,6 mm, velikost částic 2,7 μm).

Analyt	t_R^a	A_S^b	R_S^c	P_C^d
Arbutin	2,42	1,84	-	56
Kyselina chlorogenová	5,77	1,58	27,00	59
Rutin	7,33	1,64	16,63	56
Kyselina 3,5-dikafeoylchinová	8,37	-	0,94	45
Kyselina 1,5-dikafeoylchinová	8,45	-	0,94	45

K hodnocení se využil pracovní roztok pro kalibraci o koncentraci 50 mg/l.

^a Retenční čas, ^b symetrie píku, ^c rozlišení píků, ^d píková kapacita (počítaná s gradientovou elucí, 10,50 minut).

Dle FDA by mělo být rozlišení píků > 2 a symetrie píků ≤ 2 [74]. Rozlišení nebylo splněno u derivátu kyseliny chlorogenové z důvodu těsné blízkosti obou píků.

5.6.2. Validační parametry - hrušeň

Tabulka 20: Výsledné validační parametry fenolických látek s použitím Ascentis Express RP amid (150 × 4,6 mm, velikost částic 2,7 μm).

Analyt	(r^2) ^a	Kalibrační rozsah (mg/l)	Výtěžnost (%)	Přesnost (RSD, %)	Opakovatelnost (RSD, %)
Arbutin	0,999	100 – 1250	102,68	0,83	1,22; 0,63; 0,81 ^b
Kyselina chlorogenová	0,999	100 – 1250	88,66	2,69	0,49; 0,56; 0,62 ^b
Rutin	0,997	2,5 – 250	114,26	3,10	1,15; 1,28, 0,81 ^c
Kyselina 3,5-dikafeoylchinová	0,999	2,5 – 250	131,61	1,42	2,03; 2,63; 2,28 ^c
Kyselina 1,5-dikafeoylchinová	0,999	2,5 – 250	96,20	-	1,46; 3,09; 2,78 ^c

^a Korelační koeficient, ^b koncentrace 100, 500, 1000 mg/l, ^c koncentrace 20, 100, 250 mg/l

5.7. Sledování fenolického profilu v průběhu vegetace – hrušeň

V rámci disertační práce byl sledován profil výskytu fenolických látek v materiálu z hrušní během 4 period vegetačního období u jednotlivých odrůd, které jsou dále uvedeny detailně v tabulkách. Obsah fenolických látek je vyjádřen v mg/g sušiny listí, kůry, pupenů, a květů.

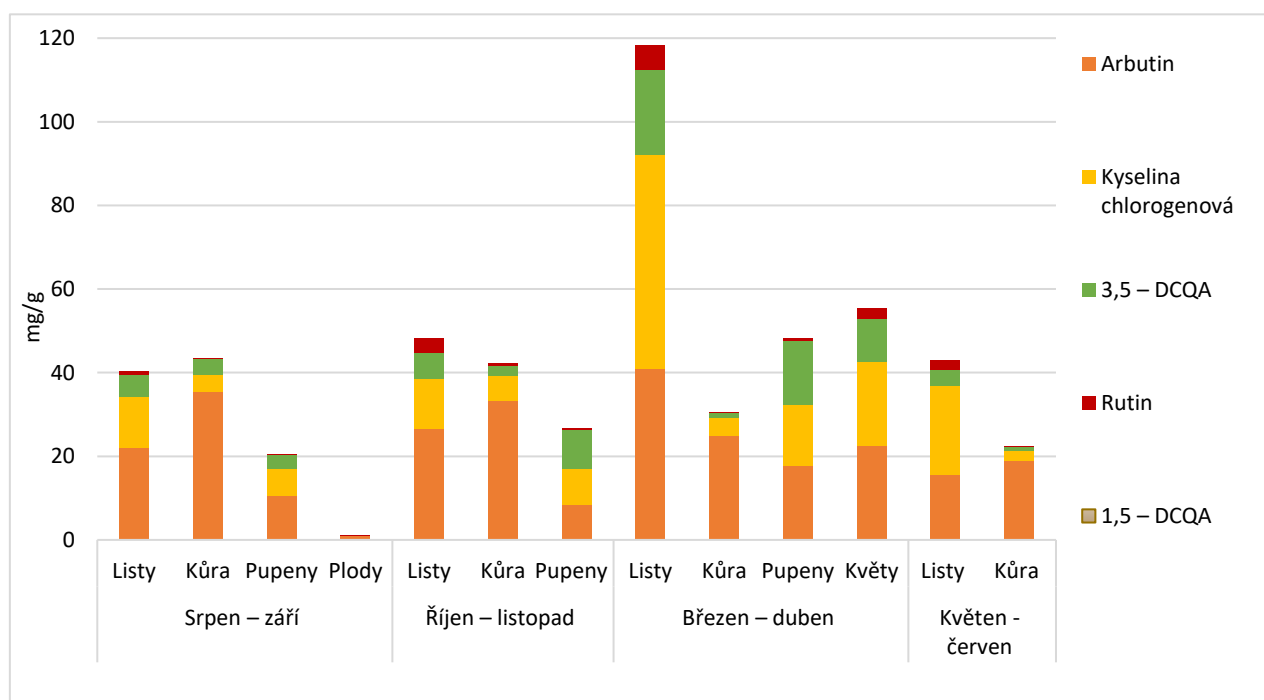
V následujících tabulkách jsou deriváty kyseliny dikafeoylchinové označené jako DCQA.

5.7.1. Odrůda 'Clapova'

Tabulka 21: Obsah fenolických látek v odrůdě 'Clapova' v mg/g.

'Clapova'	Srpen – září 2019			Říjen – listopad 2019			Březen – duben 2020				Červen 2020	
	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra	Pupeny	Květy	Listy	Kůra
Arbutin	22,13	35,31	10,54	26,48	33,41	8,33	40,86	24,86	17,69	22,59	15,42	18,84
K. chlorogenová	12,14	4,22	6,52	12,07	5,76	8,70	51,28	4,32	14,59	20,10	21,50	2,53
3,5 – DCQA	5,25	3,83	3,23	6,18	2,57	9,39	20,45	1,31	15,31	10,30	3,86	0,95
Rutin	0,94	0,23	0,06	3,56	0,56	0,33	5,74	0,17	0,69	2,46	2,33	0,16
1,5 – DCQA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celkem	40,46	43,59	20,35	48,29	42,3	26,75	118,33	30,66	48,28	55,45	43,12	22,48

Graf 16: Obsah fenolických látek v odrůdě 'Clapova' v mg/g.

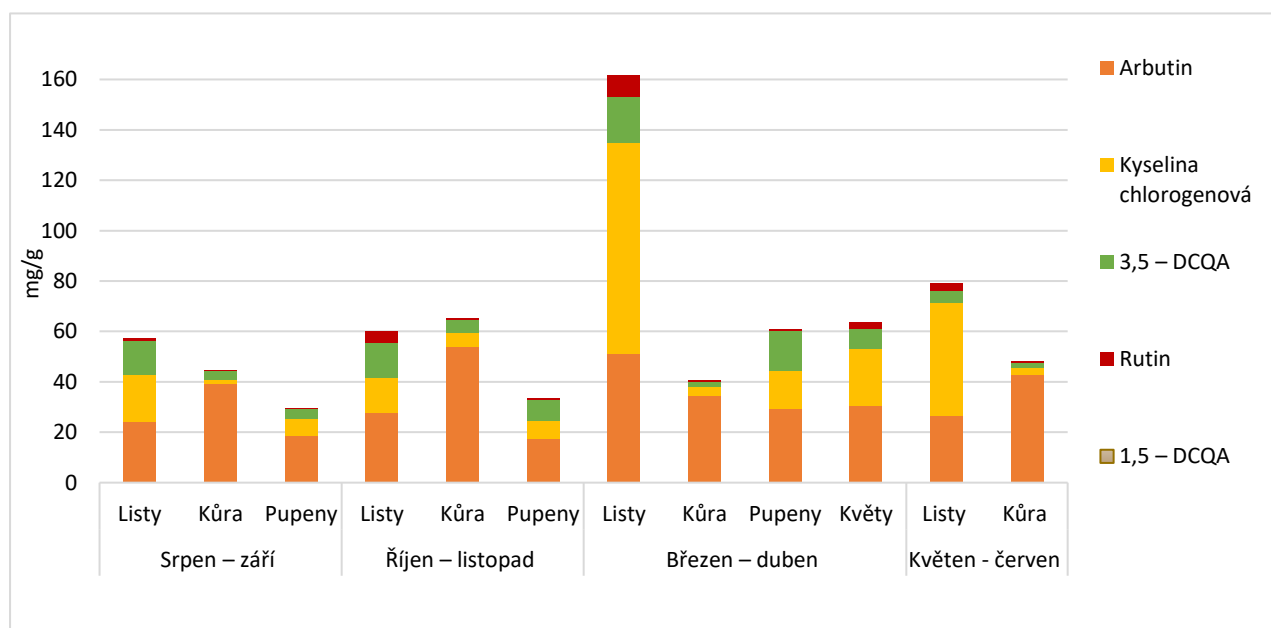


5.7.2. Odrůda 'Konference'

Tabulka 22: Obsah fenolických látek v odrůdě 'Konference' v mg/g.

'Konference'	Srpen – září 2019			Říjen – listopad 2019			Březen – duben 2020				Červen 2020	
	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra	Pupeny	Květy	Listy	Kůra
Arbutin	24,37	39,37	18,40	27,70	53,88	17,49	51,24	34,69	29,39	30,44	26,77	42,61
K. chlorogenová	18,35	1,42	7,00	14,04	5,44	7,10	83,87	3,31	14,91	22,67	44,49	3,02
3,5 – DCQA	13,63	3,59	4,07	13,91	5,55	8,57	17,96	2,00	15,88	7,79	4,90	1,88
Rutin	1,19	0,09	0,07	4,51	0,52	0,42	8,62	0,49	0,49	2,53	2,96	0,69
1,5 – DCQA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celkem	57,54	44,47	29,54	60,16	65,39	33,58	161,69	40,49	60,67	63,43	79,12	48,20

Graf 17: Obsah fenolických látek v odrůdě 'Konference' v mg/g.

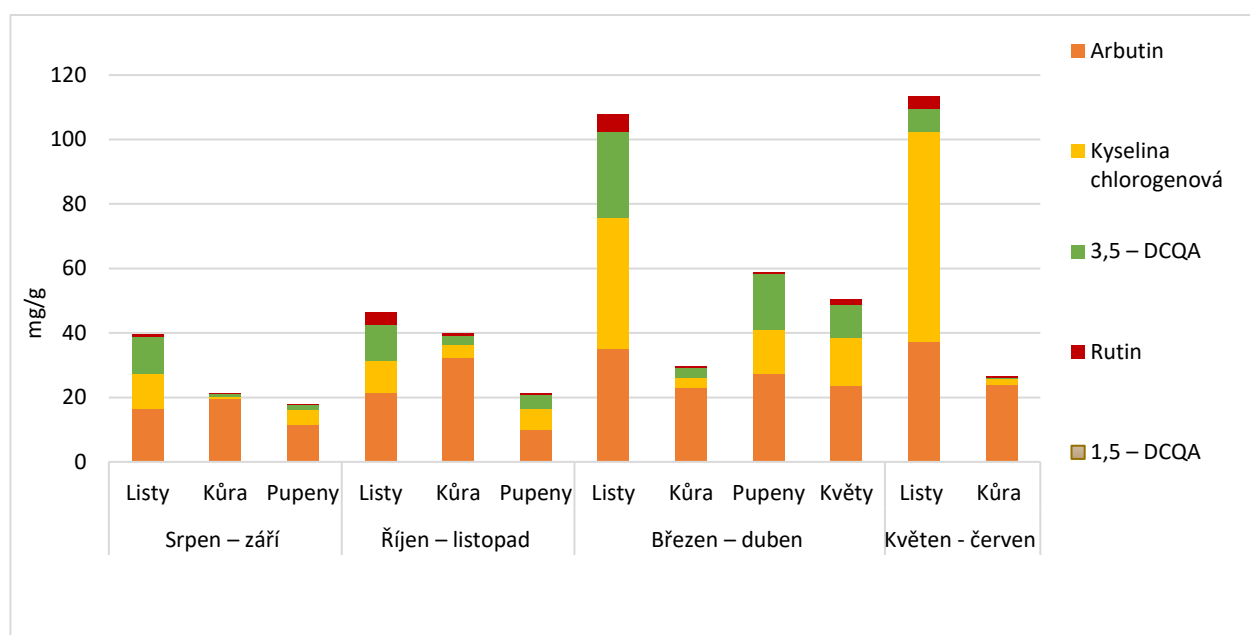


5.7.3. Odrůda 'Williamsova červená'

Tabulka 23: Obsah fenolických látek v odrůdě 'Williamsova červená' v mg/g.

'Williamsova červená'	Srpen – září 2019			Říjen – listopad 2019			Březen – duben 2020				Červen 2020	
	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra	Pupeny	Květy	Listy	Kůra
Arbutin	16,48	19,64	11,48	21,46	32,23	10,11	35,21	23,15	27,23	23,79	37,24	24,06
K. chlorogenová	10,95	0,53	4,84	9,93	4,03	6,23	40,46	3,11	13,76	14,90	65,26	1,68
3,5 – DCQA	11,45	0,96	1,39	11,20	2,66	4,50	26,64	2,80	17,49	10,03	7,14	0,49
Rutin	0,88	0,08	0,03	3,73	0,92	0,39	5,54	0,45	0,51	1,61	3,80	0,35
1,5 – DCQA	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celkem	39,76	21,21	17,74	46,32	39,84	21,23	107,85	29,51	58,99	50,33	113,45	26,58

Graf 18: Obsah fenolických látek v odrůdě 'Williamsova červená' v mg/g.

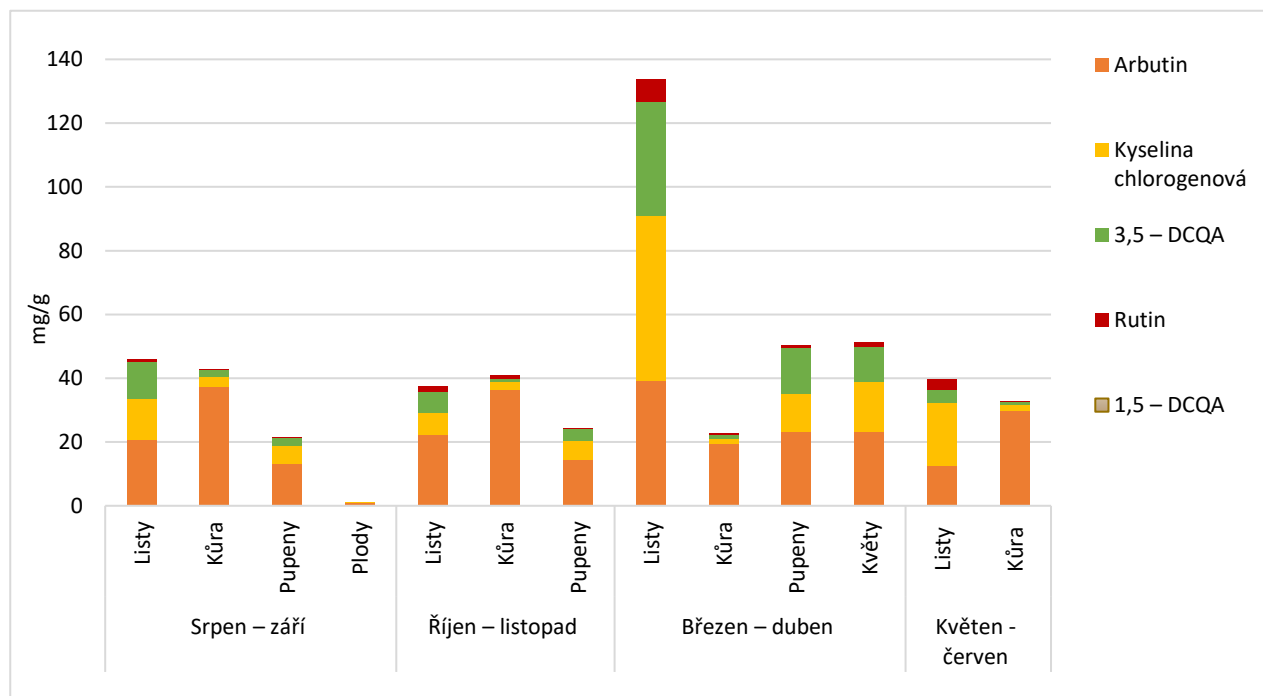


5.7.4. Odrůda 'Williamsova'

Tabulka 24: Obsah fenolických látek v odrůdě 'Williamsova' v mg/g.

'Williamsova'	Srpen – září 2019			Říjen – listopad 2019			Březen – duben 2020				Červen 2020	
	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra	Pupeny	Květy	Listy	Kůra
Arbutin	20,71	37,28	13,17	22,41	36,30	14,30	39,30	19,48	23,24	23,25	12,41	29,85
K. chlorogenová	12,65	3,02	5,62	6,63	2,67	6,27	51,57	1,68	12,01	15,58	19,97	1,93
3,5 – DCQA	11,90	2,50	2,60	6,84	0,99	3,54	35,94	1,08	14,44	10,85	4,13	0,97
Rutin	0,74	0,12	0,03	1,79	0,98	0,14	6,97	0,43	0,73	1,53	3,21	0,21
1,5 – DCQA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celkem	46	42,93	21,42	37,67	40,94	24,25	133,78	22,67	50,42	51,21	39,72	32,96

Graf 19: Obsah fenolických látek v odrůdě 'Williamsova' v mg/g.

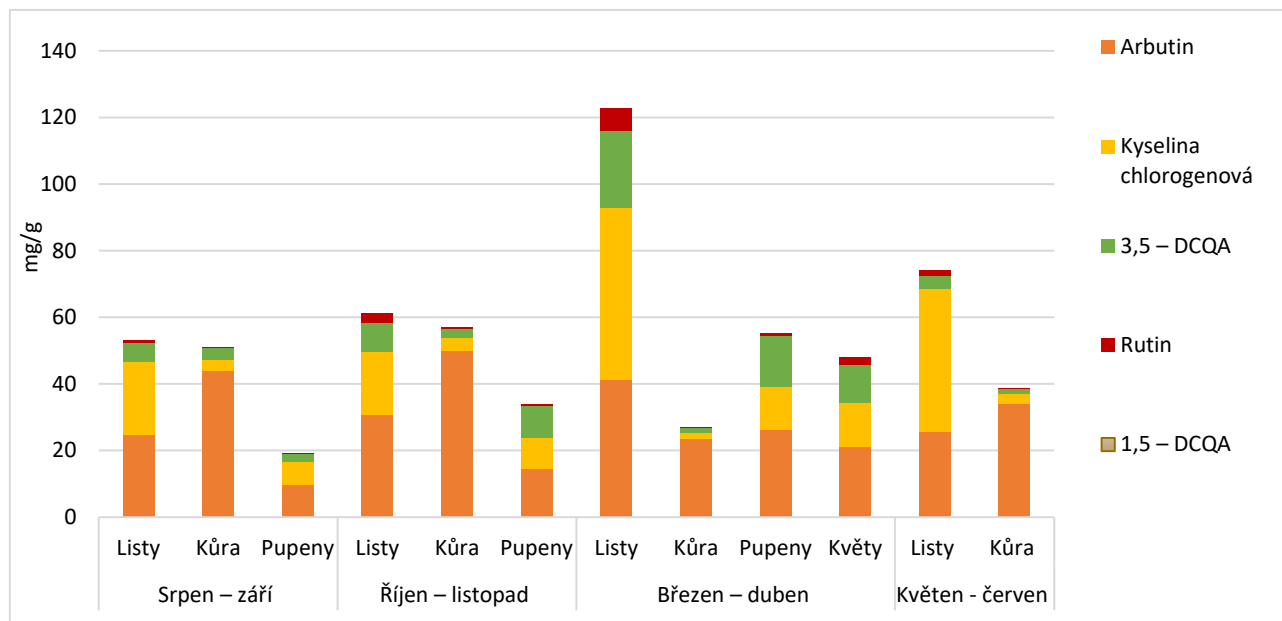


5.7.5. Odrůda 'Charneuská'

Tabulka 25: Obsah fenolických látek v odrůdě 'Charneuská' v mg/g.

'Charneuská'	Srpen – září 2019			Říjen – listopad 2019			Březen – duben 2020				Červen 2020	
	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra	Pupeny	Květy	Listy	Kůra
Arbutin	24,75	43,96	9,66	30,89	50,08	14,65	41,31	23,41	26,21	21,16	25,55	34,03
K. chlorogenová	21,87	3,28	6,90	18,72	3,80	9,07	51,73	2,08	12,87	13,32	42,99	3,09
3,5 – DCQA	5,79	3,53	2,38	8,78	2,59	9,57	23,16	1,30	15,47	11,24	3,87	1,52
Rutin	0,78	0,17	0,04	2,77	0,40	0,53	6,61	0,24	0,68	2,23	1,79	0,14
1,5 – DCQA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celkem	53,19	50,94	18,98	61,16	56,87	33,82	122,81	27,03	55,23	47,95	74,19	38,78

Graf 20: Obsah fenolických látek v odrůdě 'Charneuska' v mg/g.

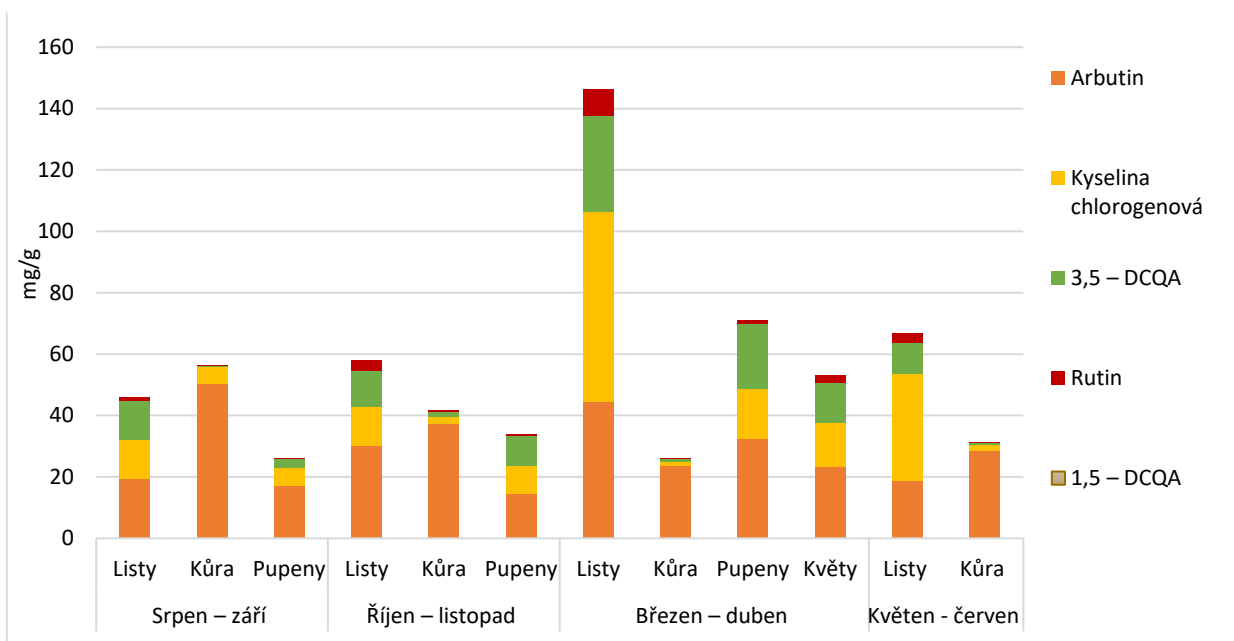


5.7.6. Odrůda 'Lucasova'

Tabulka 26: Obsah fenolických látek v odrůdě 'Lucasova' v mg/g.

'Lucasova'	Srpen – září 2019			Říjen – listopad 2019			Březen – duben 2020				Červen 2020	
	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra	Pupeny	Květy	Listy	Kůra
Arbutin	19,47	50,44	17,02	30,37	37,15	14,57	44,58	23,64	32,56	23,33	18,66	28,66
K. chlorogenová	12,74	5,57	6,02	12,42	2,26	9,11	61,73	1,24	16,07	14,37	34,83	1,79
3,5 – DCQA	12,56	0,34	2,86	11,78	1,94	9,62	31,57	0,98	21,25	12,89	10,35	0,80
Rutin	1,09	0,19	0,02	3,35	0,41	0,51	8,48	0,19	1,13	2,52	2,97	0,15
1,5 – DCQA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celkem	45,86	56,55	25,92	57,92	41,76	33,81	146,36	26,05	71,01	53,11	66,82	31,41

Graf 21: Obsah fenolických látek v odrůdě 'Lucasova' v mg/g.

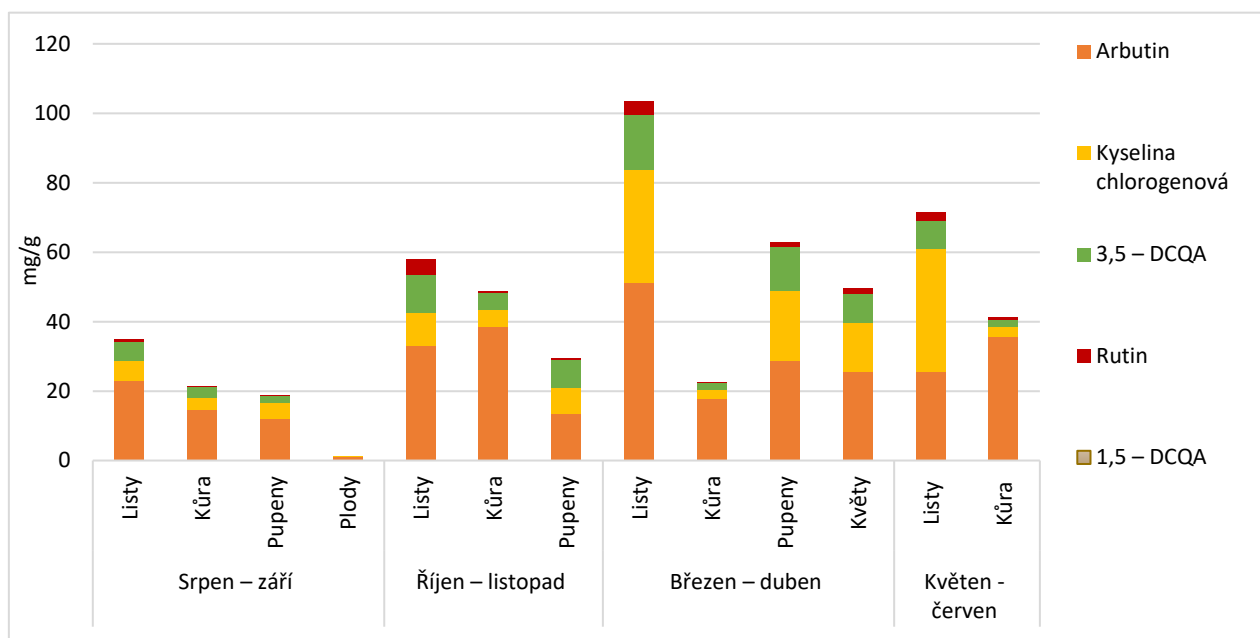


5.7.7. Odrůda 'Highland'

Tabulka 27: Obsah fenolických látek v odrůdě 'Highland' v mg/g.

'Highland'	Srpen – září 2019			Říjen – listopad 2019			Březen – duben 2020				Červen 2020	
	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra	Pupeny	Květy	Listy	Kůra
Arbutin	22,89	14,75	11,89	33,07	38,62	13,56	51,27	17,64	28,79	25,65	25,46	35,47
K. chlorogenová	5,75	3,24	4,78	9,35	4,85	7,36	32,47	2,77	20,19	14,09	35,32	3,12
3,5 – DCQA	5,68	3,37	2,07	11,18	4,70	7,92	15,66	2,10	12,64	8,31	8,35	2,06
Rutin	0,64	0,06	0,04	4,32	0,45	0,53	4,01	0,08	1,39	1,70	2,56	0,63
1,5 – DCQA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celkem	34,96	21,42	18,78	57,92	48,62	29,37	103,41	22,59	63,01	49,75	71,68	41,28

Graf 22: Obsah fenolických látek v odrůdě 'Highland' v mg/g.

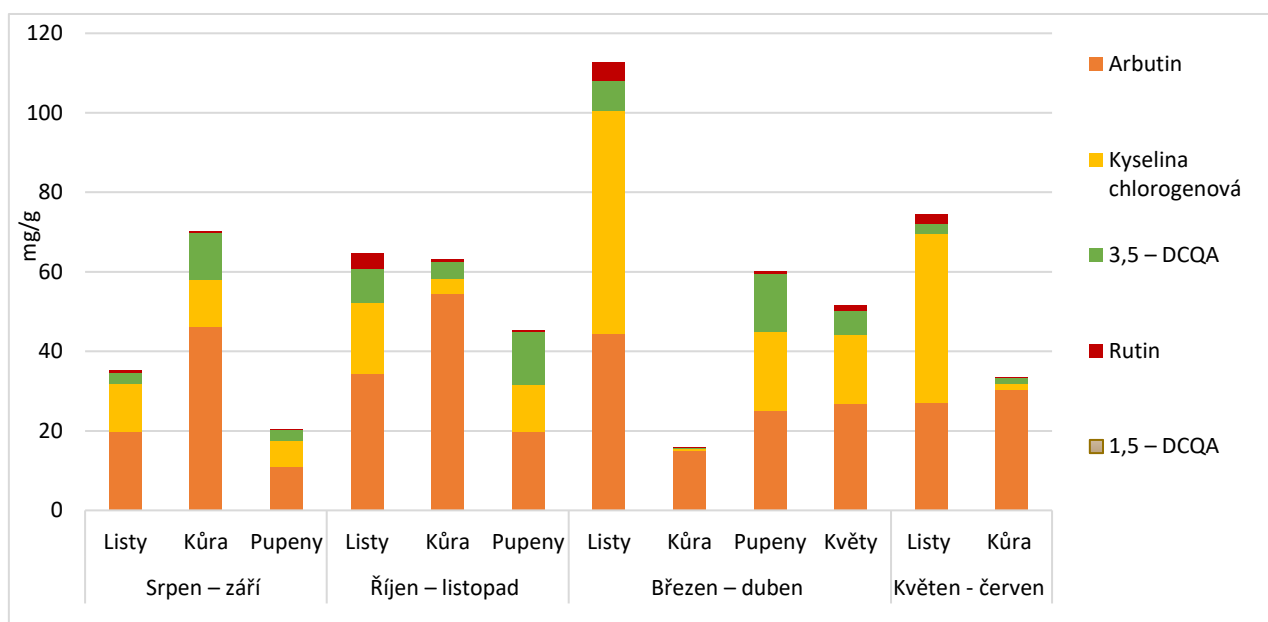


5.7.8. Odrůda 'Grosdemange'

Tabulka 28: Obsah fenolických látek v odrůdě 'Grosdemange' v mg/g.

'Grosdemange'	Srpen – září 2019			Říjen – listopad 2019			Březen – duben 2020				Červen 2020	
	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra	Pupeny	Květy	Listy	Kůra
Arbutin	19,87	46,21	11,08	34,45	54,61	19,67	44,40	15,06	25,19	26,81	27,07	30,24
K. chlorogenová	11,86	11,76	6,37	17,93	3,56	11,81	55,99	0,39	19,74	17,24	42,47	1,76
3,5 – DCQA	2,90	11,87	2,95	8,34	4,45	13,48	7,73	0,23	14,75	6,22	2,58	1,32
Rutin	0,56	0,38	0,02	3,79	0,51	0,34	4,54	0,06	0,54	1,26	2,29	0,09
1,5 – DCQA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celkem	35,19	70,22	20,42	64,51	63,13	45,3	112,66	15,74	60,22	51,53	74,41	33,42

Graf 23: Obsah fenolických látek v odrůdě 'Grosdemange' v mg/g.

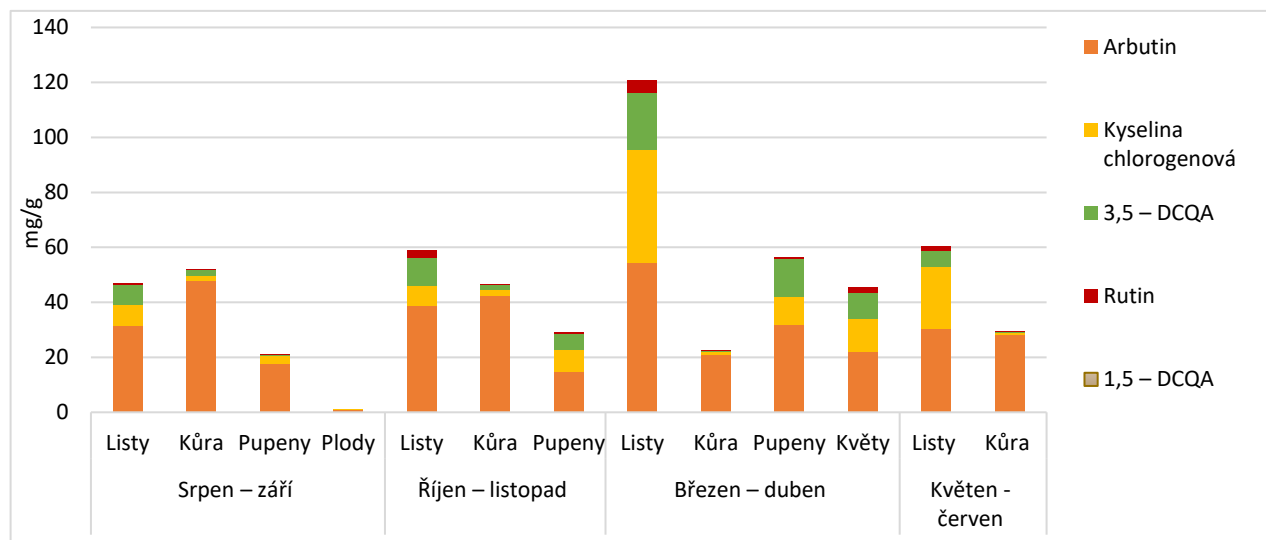


5.7.9. Odrůda 'Thirriotova'

Tabulka 29: Obsah fenolických látek v odrůdě 'Thirriotova' v mg/g.

'Thirriotova'	Srpen – září 2019			Říjen – listopad 2019			Březen – duben 2020				Červen 2020	
	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra	Pupeny	Květy	Listy	Kůra
Arbutin	31,45	47,73	17,52	38,73	42,32	14,79	54,42	20,98	32,07	22,00	30,28	28,16
K. chlorogenová	7,51	2,03	2,86	7,41	2,23	7,98	41,25	0,84	9,86	11,82	22,63	0,94
3,5 – DCQA	7,51	2,02	0,59	10,19	1,94	5,86	20,49	0,64	13,96	9,70	5,81	0,40
Rutin	0,68	0,11	0,01	2,78	0,23	0,45	4,45	0,20	0,63	1,92	1,51	0,07
1,5 – DCQA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celkem	47,15	51,89	20,98	59,11	46,72	29,08	120,61	22,66	56,52	45,44	60,23	29,57

Graf 24: Obsah fenolických látek v odrůdě 'Thirriotova' v mg/g.

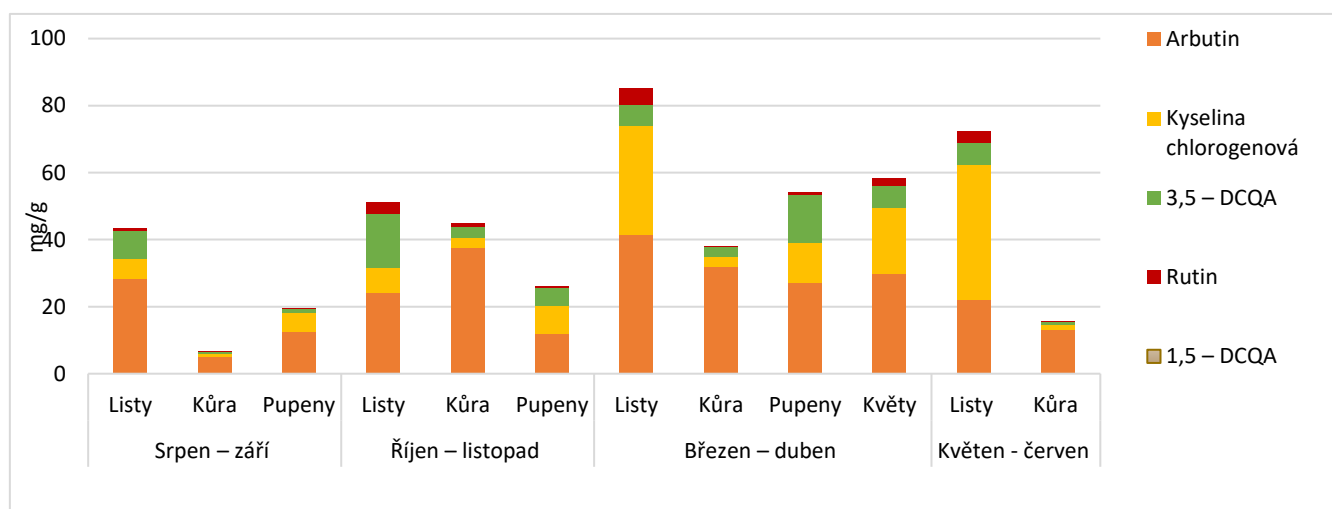


5.7.10. Odrůda 'General Leclerc'

Tabulka 30: Obsah fenolických látek v odrůdě 'General Leclerc' v mg/g.

'General Leclerc'	Srpen – září 2019			Říjen – listopad 2019			Březen – duben 2020				Červen 2020	
	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra	Pupeny	Květy	Listy	Kůra
Arbutin	28,29	5,12	12,56	24,23	37,49	12,03	41,57	31,90	27,06	29,68	22,12	13,16
K. chlorogenová	5,90	0,75	5,54	7,45	2,98	8,18	32,29	2,97	12,11	19,90	40,21	1,43
3,5 – DCQA	8,44	0,74	1,39	15,94	3,40	5,47	6,26	2,91	14,24	6,36	6,66	1,01
Rutin	0,88	0,04	0,02	3,56	1,03	0,39	4,92	0,21	0,82	2,27	3,44	0,10
1,5 – DCQA	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celkem	43,51	6,65	19,51	51,18	44,9	26,07	85,04	37,99	54,23	58,21	72,43	15,76

Graf 25: Obsah fenolických látek v odrůdě 'General Leclerc' v mg/g.



5.7.11. Štěpka hrušní

K přípravě směšného vzorku štěpky z hrušní byly použity odrůdy 'Konference', 'Clapova', 'Lucasova' a 'Charneuská'.

Tabulka 31: Obsah fenolických látek ve směšném vzorku štěpky hrušní v mg/g.

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

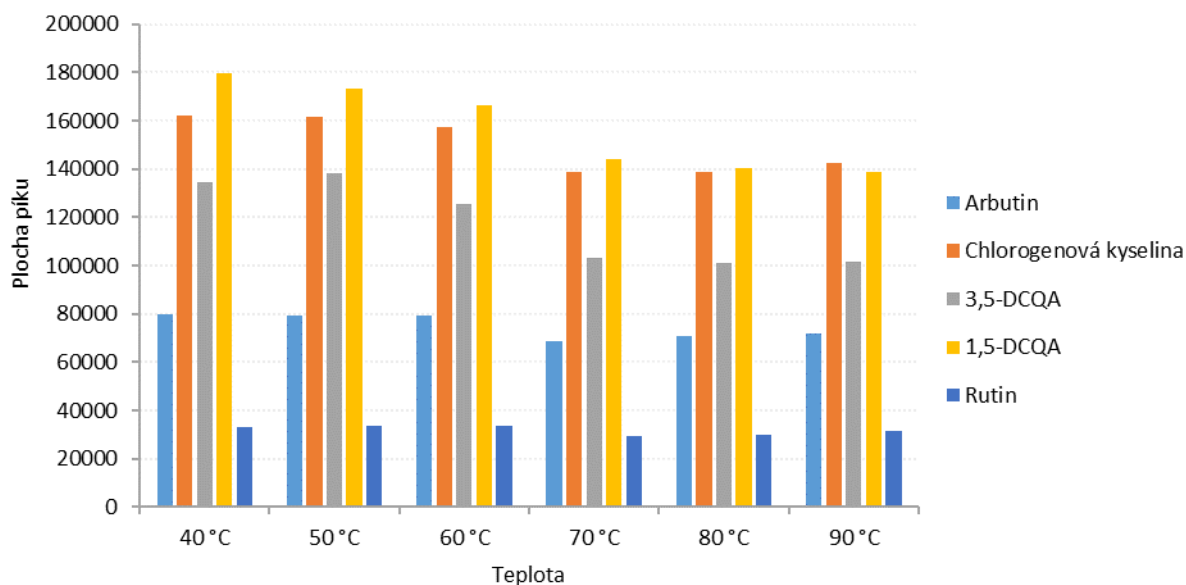
Výsledky ze sledování vegetačního období a štěpky byly součástí diplomové práce [91].

5.7.12. Extrakce horkou vodou

Pro hledání levnějšího, méně toxického a ekologičtějšího rozpouštědla byla vyzkoušena voda, která byla zvolena jako náhrada metanolu pro extrakci hrušňového listí. Dalším důvodem k provedení tohoto experimentu byl fakt, že konzumace vodných extraktů z listí medvědice lékařské (s vysokým obsahem arbutinu) byla oficiálně schválena pro léčbu močových infekcí [45]. Výsledky této práce tak mohou vést k praktickému využití i hrušňového listí pro přípravu vodných infúzí (čajů) s příznivým účinek na lidské zdraví.

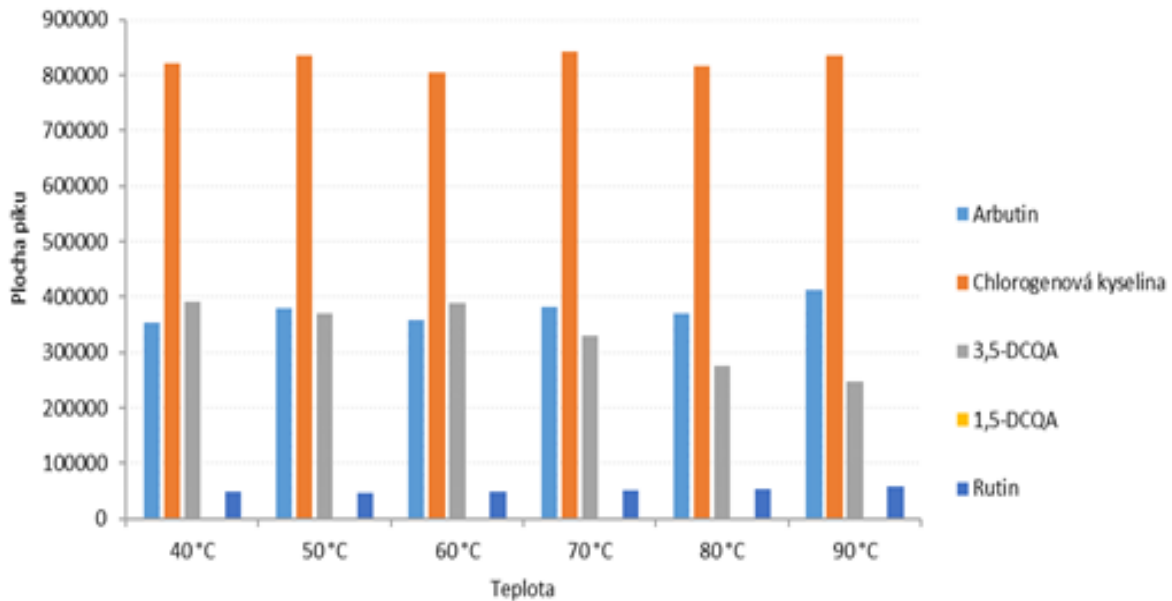
Nejprve byl vyzkoušen vliv různých teplot v rozmezí 40 °C – 90 °C na stabilitu směsného standardního roztoku po dobu 10 minut. Bylo zjištěno, že výtěžek extrakce fenolických látek byla vyšší u teplot 40 °C – 60 °C. U vyšších teplot se výtěžky snižovaly (graf 26). To může být spojeno s tepelně indukovaným rozkladem.

Graf 26: Vliv různé teploty na stabilitu směsného standardního roztoku.

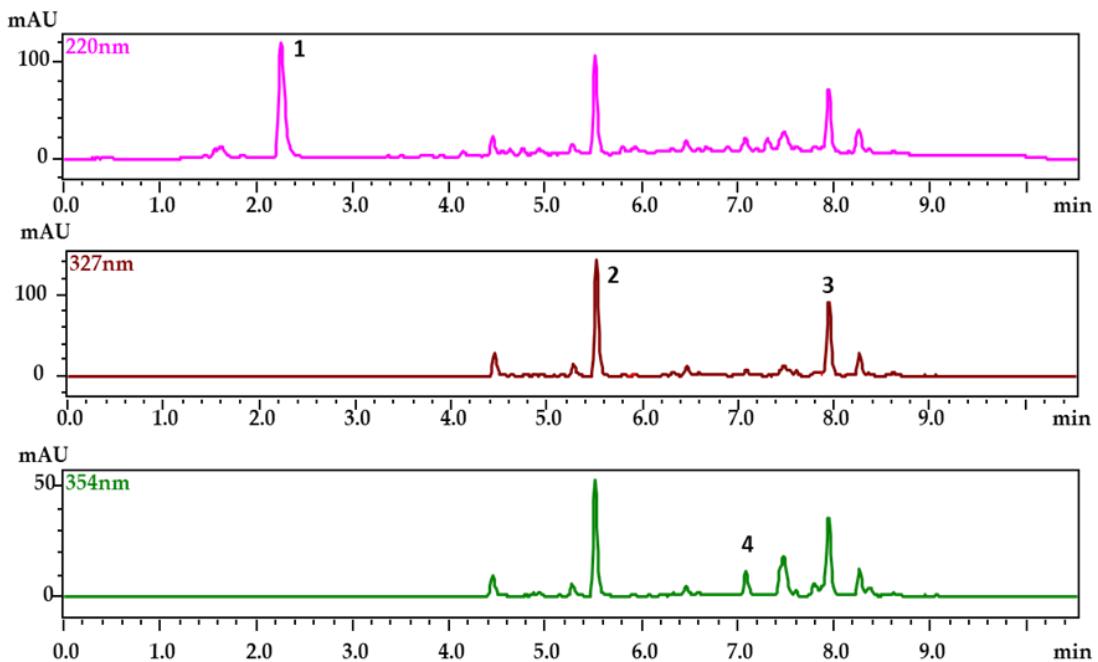


Stejný experiment byl proveden s reálnou odrůdou „Konference“. Teplota neměla dramatický dopad na výtěžek jednotlivých fenolických látek. Graf 27 však ukazuje, že výtěžek extrakce kyseliny 3,5-dikafeoylchinové se snížil, když se teplota zvýšila ze 70 °C na 90 °C.

Graf 27: Vliv různé teploty vody na extrakt z listů u odrůdy 'Konference'.



Po těchto počátečních experimentech se ukázalo, že vhodná teplota vody pro extrakci je od 40 °C do 60 °C. Spotřebitelé preferují podávání horkých nápojů od 54,4 °C do 71,1 °C [92]. Rozhodli jsme se proto zvolit optimální teplotu vody 60 °C pro extrakci fenolických sloučenin v 10 různých kultivarech listů hrušní. Chromatogram reálného vodného extraktu z hrušňového listí je vyobrazen na obrázku 10.

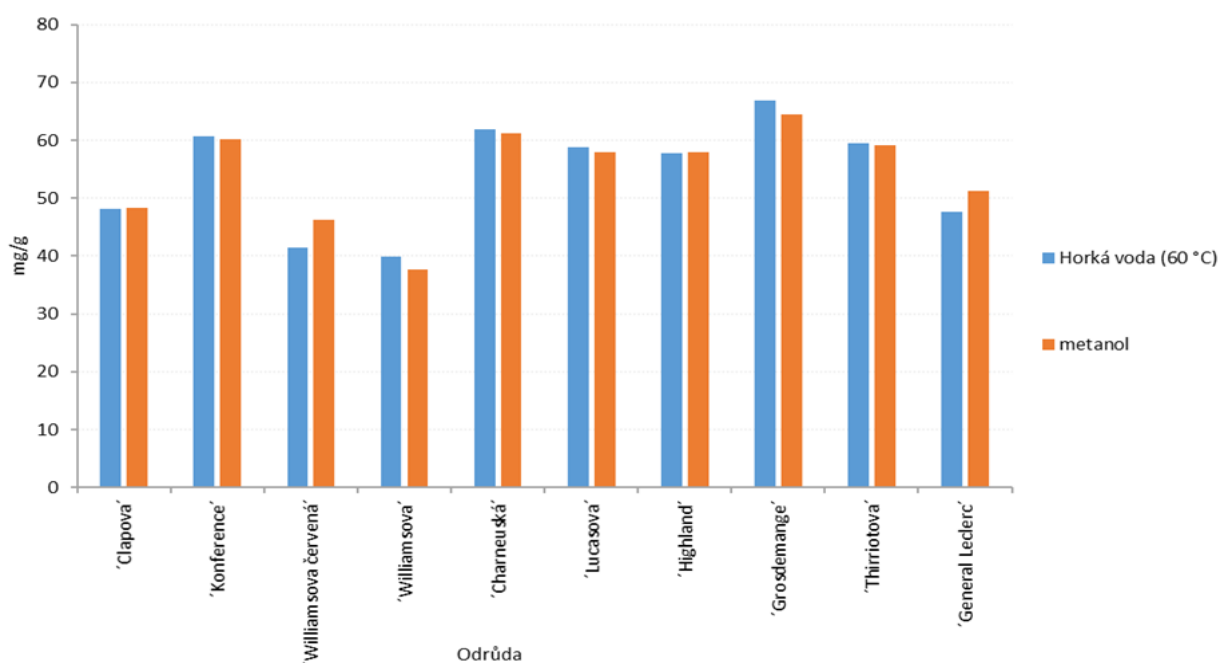


Obrázek 10: Chromatogram reálného extraktu z listů hrušně za použití horké vody. (1) arbutin, (2) kyselina chlorogenová, (3) kyselina 3,5-dikafeylchinová, (4) rutin.

5.7.12.1. Celkový obsah fenolických látek v horké vodě a metanolových extraktech

Voda při teplotě 60 °C byla využita k extrakci fenolických látek z listů hrušní pocházející z odběru říjen – listopad 2019 a výsledné koncentrace byly srovnány se vzorky pocházející ze stejného období (kapitola 4.1.). Bylo zjištěno, že celkové koncentrace fenolických látek při extrakci různými rozpouštědly vykazovaly podobné výsledky, avšak horká voda jako rozpouštědlo vedla k mírně vyšším výsledkům (graf 28). Dále, jak je patrné z obrázku 4, extrakce za pomoci horké vody představuje eliminaci extrakčních kroků, jako je ultrazvuková lázeň a centrifugace. Doba extrakce se tak zkrátí (o 35 minut).

Graf 28: Srovnání obsahu fenolických látek v metanolu a horké vodě.



5.7.12.2. Antimikrobiální aktivita vodních extraktů hrušňového listí

Antimikrobiální aktivita vodních extraktů listí hrušní byla zjišťována proti *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Francisella tularensis*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* a *Staphylococcus aureus*. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 32.

Tabulka 32: Antimikrobiální aktivita vodních extraktů listů pocházející z různých odrůd hrušní demonstrována jako průměr inhibiční zóny růstu bakterií [mm].

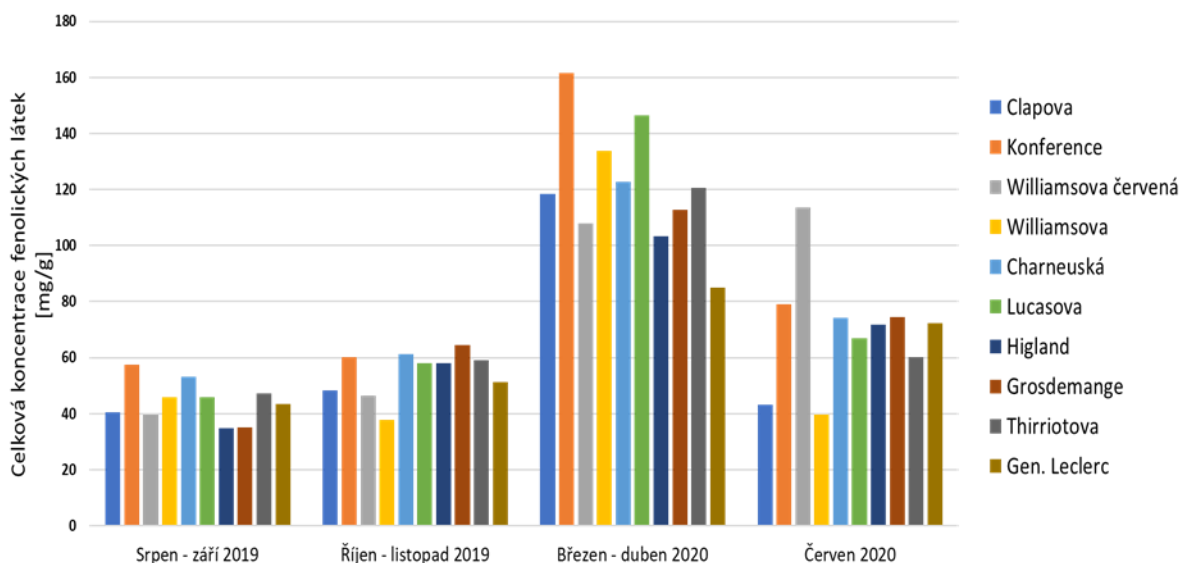
Antibiotika Odrůdy	<i>Francisella tularensis</i> LVS	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111	<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Salmonella enterica</i> ATCC 9222	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 10832	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775
Tetracyklin	41	-	-	-	-	-	-
Trimethoprim/sulfamethoxazol	-	19	-	-	-	-	-
Piperacillin/tazobaktam	-	-	-	22	-	-	-
Ampicillin	-	-	-	-	8,3	-	15
Vankomycin	-	-	-	-	-	13,9	-
´Clapova´	13,0	23,7	0	13,5	0	0	0
´Konference´	13,4	0	0	13,8	0	0	0
´Williamsova červená´	0	23,7	0	13,3	0	0	0
´Williamsova´	0	24,4	0	10,6	0	0	0
´Charneuská´	10,5	25,7	0	11,8	0	0	0
´Lucasova´	13,0	0	0	13,1	0	0	0
´Highland´	12,1	24,6	0	11,4	0	0	0
´Grosdemange´	17,0	20,9	0	18,5	0	7,5	8
´Thirriotova´	12,6	27,9	0	15,1	0	0	0
´General Leclerc´	19,0	24	0	19,4	8,1	9	8,6

5.7.13. Souhrn výsledků – hrušeň

Vzorky z 10-ti odrůd hrušní byly odebírány 4krát za rok. První odběr byl proveden v období srpen – září s celkovou sumou fenolických látek v rozmezí 34,95 mg/g DW (‘Highland’) – 53,19 mg/g DW (‘Charneuská’) v listech, 6,65 mg/g DW (‘General Leclerc’) – 70,22 mg/g DW (‘Grosdemange’) v kůře a 17,75 mg/g DW (‘Williamsova červená’) – 29,54 mg/g DW (‘Konference’) v pupenech. Suma fenolických látek v období říjen – listopad byla 37,68 mg/g DW (‘Williamsova’) – 64,51 mg/g DW (‘Grosdemange’) v listech, 39,84 mg/g DW (‘Williamsova červená’) – 65,39 mg/g DW (‘Konference’) v kůře a 21,24 mg/g DW (‘Williamsova červená’) – 45,30 mg/g DW (‘Grosdemange’) v pupenech. Jarní období (březen – duben) nabídlo celkovou sumu v rozmezí 85,04 mg/g DW (‘General Leclerc’) – 161,69 mg/g DW (Konference) v listech, 15,74 mg/g DW (‘Grosdemange’) – 40,49 mg/g DW (‘Konference’) v kůře, 48,28 mg/g DW (‘Clapova’) – 71,01 mg/g DW (‘Lucasova’) v pupenech a 45,44 mg/g DW (‘Thirriotova’) – 63,43 mg/g DW (‘Konference’) v květech. V červnu byla nalezena suma 39,72 mg/g DW (‘Williamsova’) – 113,45 mg/g DW (‘Williamsova červená’) v listech a 15,71 mg/g DW (‘General Leclerc’) – 48,20 mg/g DW (‘Konference’) v kůře. Směsný vzorek štěpky obsahuje 23,08 mg/g DW fenolických látek.

Majoritními fenolickými látkami byly arbutin a kyselina chlorogenová. V žádném vzorku nebyla zjištěna kyselina 1,5-dikafeoylchinová. Největší záchyt fenolických látek byl zaznamenán v jarním období, tedy stejně jako u jabloně. Nejvyšší obsah, nad hladinou 140 mg/g, byl nalezen u odrůdy ‘Konference’ a ‘Lucasova’. Následně byl u všech odrůd (kromě ‘Williamsova červená’) sledován pokles v obsahu fenolických látek. Například u odrůdy ‘Konference’ došlo ke snížení obsahu až o 50 % mezi jarním a podzimním obdobím. Podobně u ‘Williamsova’ byl pozorován pokles o víc jak 70 % mezi jarním a letním obdobím. Detailní grafický záznam sumy fenolických látek během sledování vegetačního období u jednotlivých odrůd je vyobrazen v grafu 29.

Graf 29: Graf závislosti celkové koncentrace fenolických látek v 10 odrůdách hrušní [mg/g] na daném období.



Rovněž bylo zjištěno, že účinným extrakčním činidlem je také horká voda (60 °C, 10 minut), která má srovnatelné výtěžky jako při použití metanolu. U vodných extraktů z listí byla zjištěna antimikrobiální aktivita. Ukázalo se, že všechny odrůdy vykazovaly antimikrobiální aktivitu proti gramnegativní bakterii *Pseudomonas aeruginosa*, která je běžnou příčinou nozokomiálních infekcí zejména u popálených pacientů [93]. Vysoká antimikrobiální aktivita byla taky pozorována proti grampozitivní bakterii *Listeria monocytogenes*, která jako alimentární patogen způsobuje onemocnění zvané listerióza. Z výsledků je patrné, že hrušňové listí může být také s výhodou použito například pro přípravu čajových infuzí.

6. ZÁVĚR A BUDOUCÍ PERSPEKTIVA

Předložená disertační práce se zabývá stanovením fenolických látek v rostlinném materiálu běžně pěstovaných ovocných stromů – jabloní a hrušní. Začátek teoretické části se věnuje tomu, jak je množství fenolických látek ovlivněno škůdci a chorobami stromů. Následně je popsána syntéza fenolických látek a srovnání obsahových látek v listí s plody. Hlavní část se soustřeďuje na nejnovější vědecké studie, které se zabývají výskytem, aplikačním potenciálem a účinky studovaných analytů na živé organismy. Nejvíce je rozebírán floridzin (především *in vivo* studie), neboť jeho koncentrace ve studovaných vzorcích byla nejvyšší ze všech sledovaných analytů. Druhá část teoretické části se věnuje instrumentálním možnostem stanovení fenolických látek s důrazem na kapalinovou chromatografii včetně uvedení moderních směrů (UHPLC, SFC, 2D-LC). Jsou sepsány praktické poznatky v možnostech využití různých typů kolon a detekčních zařízení. Není opomíjena problematika extrakce fenolických látek z rostlinného materiálu a jsou uvedeny základní informace o validaci analytických metod.

Úvod praktické části je věnován vývoji, optimalizaci a validaci dvou chromatografických metod. V rámci této práce byly využity metody pro separaci hlavních fenolických látek (floridzin, floretin, kyselina chlorogenová a její deriváty, rutin, arbutin a kvercitrin) v rostlinném materiálu jabloní a hrušní. U obou metod byla mobilní fáze složena z organické složky (acetonitril) a vodné složky (0,1% kyselina fosforečná, pH = 2,2) za použití gradientové eluce. Dávkovaný objem byl 1 μ l a teplota kolonového prostoru 30 °C. Byl využit detektor diodového pole. Pro separaci fenolických látek byla využita kolona YMC Triart C18 ExRS (150 \times 4,6 mm, velikost částic 5 μ m) (fenolické látky v materiálu z jabloní) a Ascentis Express RP amid (150 \times 4,6 mm, velikost částic 2,7 μ m) (fenolické látky v materiálu z hrušní).

V rámci optimalizace metody je například diskutováno procentuální zastoupení organické složky mobilní fáze na počátku gradientu či teplota kolonového prostoru a vliv těchto parametrů na výsledný chromatogram. Kriticky jsou zhodnoceny různé typy stacionárních fází s cílem nalézt vhodný kompromis mezi rychlostí separace a vhodností validačních parametrů. Výsledná validace (linearita, výtěžnost, přesnost, opakovatelnost) je rovněž u obou vyvinutých metod uvedena.

Dále je uveden proces extrakce látek z rostlinné matrice do kapaliny pomocí ultrazvukové lázně a roztoku metanolu a kyseliny mravenčí. Kritickým a počátečním bodem je důkladná homogenizace rostlinné matrice, která rozhoduje o správnosti celé extrakce.

Stěžejní část práce je věnována výsledkům. Hlavní úkol se soustřeďuje na měnící se fenolický profil v průběhu vegetačního období. Sledovaným materiálem bylo listí, kůra, pupeny a květy s ohledem na dostupnost v průběhu roku. Pro maximální zhodnocení dostupného materiálu ze stromů byla do spektra vzorků zahrnuta i štěpka. Bylo prokázáno, že vegetační období má vliv na koncentraci fenolických látek. U jabloní i hrušní byl největší obsah fenolických látek zachycen v jarním období. U 10-ti odrůd jabloní byl v tomto období zjištěn obsah v rozmezích 164,25 mg/g DW – 228,85 mg/g DW v listech, 48,76 mg/g DW – 73,01 mg/g DW v kůře, 96,57 mg/g DW – 176,45 mg/g DW v pupenech a 74,91 mg/g DW – 132,43 mg/g DW v květech. Štěpka je rovněž nezanedbatelným zdrojem fenolických látek (50,73 mg/g DW). Největší výskyt fenolických látek byl zjištěn u odrůdy 'Rubinstep'. U 10-ti odrůd hrušní byl v jarním období zjištěn obsah sledovaných látek v rozmezí 85,04 mg/g DW – 161,69 mg/g DW v listech, 15,74 mg/g DW – 40,49 mg/g DW v kůře, 48,28 mg/g DW – 71,01 mg/g DW v pupenech a 45,44 mg/g DW – 63,43 mg/g DW v květech. Hodnotnou biomasu tvoří také i štěpka, jejíž směsný vzorek obsahuje 23,08 mg/g DW fenolických látek. Nejvýznamnější z hlediska obsahu sledovaných látek je odrůda 'Konference'. Napříč celým sledovaným obdobím byl největší obsah zaznamenán v listech.

U listí hrušní byla dále vyzkoušena horká voda jako extrakční rozpouštědlo a porovnána s běžným postupem pomocí metanolu. Výsledkem byly srovnatelné či vyšší výtěžky fenolických látek pomocí horké vody. Ta, oproti jiným běžně využívaným rozpouštědlům, je levná, lehce dostupná, netoxická a v budoucnosti by tak mohla být více zastoupená v postupech 'zelených' analytických metod. Byla také prokázána antimikrobiální aktivita vodných extraktů. Z tohoto důvodu lze říci, že zpracování listí do nápojů (čajů) představuje jeden ze způsobů, jak přijmout fenolické látky z listí a využít tak jejich benefiční účinek.

Obsah fenolických sloučenin ve studovaném materiálu je vysoký. Navíc jejich množství je mnohonásobně vyšší než v samotných plodech. V tom spočívá jedna z originalit této práce, jejíž cílem je přinést společnosti povědomí, že nejen plody ovocných stromů jsou zdraví prospěšné. Dle této práce a vědeckých publikací je v listí mnohonásobně více nejen fenolických látek, ale i minerálních látek (vápník a hořčík), organických látek a isoprenoidů.

Toto zjištění může být atraktivní pro vývoj nových produktů, protože poptávka a spotřeba potravních doplňků a léčiv neustále stoupá. Izolace bioaktivních sloučenin z hojného a snadno dostupného materiálu do léčiv, doplňků stravy či kosmetiky poskytuje velký potenciál pro zlepšení kvality zdraví.

Příklad, jak lze listí využít do formy doplňku stravy je následující. V praxi může být vhodně extrahován (macerace), nanesen na vhodný nosič (například celulóza) za vzniku práškové formy. Tato pevná forma může být výchozí surovinou pro výrobu různých formulací doplňků stravy. Za použití excipientů mohou být vyrobeny například dražé, tabletky či tobolky.

Diskuzní otázkou zůstává, proč se nejvíce fenolických látek hromadí v listech a jiném rostlinném materiálu stromů a nikoliv v plodech. Vysvětlením může být to, že studovaný materiál je vystaven dlouhodobému stresu (například intenzivní a dlouhodobé sluneční záření, škůdci), což může vést k akumulaci fenolických látek pro zvýšení ochranných mechanismů.

Majoritní fenolickou sloučeninou u jabloňového stromu je floridzin, který je znám především pro hypoglykemické účinky. V hrušni se převážně nachází arbutin užitečný pro podpůrnou léčbu močových infekcí a často se používá v kosmetice. V obou případech se hojně vyskytuje kyselina chlorogenová, která má také hypoglykemický efekt, působí proti hypertenzi a používá se k redukci hmotnosti. Za zmínku stojí i rutin používaný pro zlepšení kvality cév.

Studované vzorky jsou doposud nevyužívaný zemědělský materiál, který představuje levný a lehce dostupný zdroj prospěšných látek a má tak výhodný ekonomický potenciál. V celé populaci roste zájem o zdravý životní styl, zároveň i o recyklaci nevyužívaného materiálu, a proto předpokládáme, že v případě znovuvyužití do komerčního produktu poroste zájem i o analýzu rostlinného materiálu. Tato práce nabízí „manuál“ pro provádění HPLC-DAD rutinních analýz pro separaci hlavních fenolických látek v ovocných stromech (jabloň, hrušeň) a umožňuje vybrat tak materiál s co největším množstvím bioaktivních látek.

Trochu z jiného úhlu pohledu jsou extrakty listí pocházející z různých rostlin mnoho let používány v tradiční a lidové medicíně k léčbě chronických onemocnění. Jejich konzumace je populárnější v asijských státech (Čína, Japonsko, Korea, Vietnam). EFSA schválila např. použití listových extraktů a infuzí z *Arctostaphylos uva-ursi*, *Rubus idea* a *Ribes nigrum* jako léčivé přípravky. V tomto ohledu není proto důvod opomíjet i listí ovocných stromů, které mohou mít stejný potenciál.

7. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Struktura povrchově porézní částice	34
Obrázek 2: Zjednodušené schéma procesu SFE	40
Obrázek 3: Stanovovaný materiál.....	43
Obrázek 4: Porovnání dvou metod použitých k přípravě extraktů z listí.	44
Obrázek 5: Separace analytů při změně koncentrace acetonitrilu na počátku gradientu.....	50
Obrázek 6: Chromatogram směsného roztoku standardů na koloně YMC Triart C18 ExRS (150 × 4,6 mm, velikost částic 5 μm).....	52
Obrázek 7: Chromatogram fenolických sloučenin z extraktu z kůry jabloní.	52
Obrázek 8: Chromatogram směsného roztoku standardů na koloně Ascentis Express RP amid (150 × 4,6, velikost částic 2,7 μm).....	67
Obrázek 9: Chromatogram fenolických sloučenin z extraktu z listí hrušní.....	68
Obrázek 10: Chromatogram reálného extraktu z listí hrušně za použití horké vody.....	81

8. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Koncentrace floridzinu v různých částech jabloňového stromu.....	23
Tabulka 2: Fyzikálně-chemické vlastnosti stanovených fenolických látek.	31
Tabulka 3: Přehled publikovaných prací zaměřující se na HPLC analýzy fenolických látek v materiálu ovocných stromů.....	37
Tabulka 4: Chromatografický systém a podmínky separace.	45
Tabulka 5: Chromatografický systém a podmínky separace.	47
Tabulka 6: Test vhodnosti chromatografického systému s použitím kolony YMC Triart C18 ExRS (150 × 4,6 mm, velikost částic 5 μm).....	53
Tabulka 7: Výsledné validační parametry fenolických látek s použitím kolony YMC Triart C18 ExRS (150 × 4,6 mm, velikost částic 5 μm).	54
Tabulka 8: Koncentrace fenolických látek v odrůdě 'Topaz' v mg/g.	55
Tabulka 9: Koncentrace fenolických látek v odrůdě 'Golden Delicious' v mg/g.	56
Tabulka 10: Koncentrace fenolických látek v odrůdě 'Angold' v mg/g.	57
Tabulka 11: Koncentrace fenolických látek v odrůdě 'Meteor' v mg/g.	58
Tabulka 12: Koncentrace fenolických látek v odrůdě 'Melrose' v mg/g.	59
Tabulka 13: Koncentrace fenolických látek v odrůdě 'Fuji' v mg/g.....	60
Tabulka 14: Koncentrace fenolických látek v odrůdě 'Braeburn' v mg/g.	61
Tabulka 15: Koncentrace fenolických látek v odrůdě 'Lady Silvia' v mg/g.....	62
Tabulka 16: Koncentrace fenolických látek v odrůdě 'Rubinstep' v mg/g.	63
Tabulka 17: Koncentrace fenolických látek v odrůdě 'Rubin' v mg/g.	64
Tabulka 18: Koncentrace fenolických látek ve vzorku štěpky jabloní v mg/g.	65

Tabulka 19: Test vhodnosti chromatografického systému s použitím kolony Ascentis Express RP amide (150 × 4,6 mm, velikost částic 2,7 μm).	69
Tabulka 20: Výsledné validační parametry fenolických látek s použitím Ascentis Express RP amid (150 × 4,6 mm, velikost částic 2,7 μm).....	69
Tabulka 21: Koncentrace fenolických látek v odrůdě 'Clapova' v mg/g.....	70
Tabulka 22: Koncentrace fenolických látek v odrůdě 'Konference' v mg/g.....	71
Tabulka 23: Koncentrace fenolických látek v odrůdě 'Konference' v mg/g.....	72
Tabulka 24: Koncentrace fenolických látek v odrůdě 'Williamsova' v mg/g.....	73
Tabulka 25: Koncentrace fenolických látek v odrůdě 'Charneuská' v mg/g.	74
Tabulka 26: Koncentrace fenolických látek v odrůdě 'Lucasova' v mg/g.....	75
Tabulka 27: Koncentrace fenolických látek v odrůdě 'Highland' v mg/g.....	76
Tabulka 28: Koncentrace fenolických látek v odrůdě 'Grosdemange' v mg/g.....	77
Tabulka 29: Koncentrace fenolických látek v odrůdě 'Thirriotova' v mg/g.	78
Tabulka 30: Koncentrace fenolických látek v odrůdě 'General Leclerc' v mg/g.	79
Tabulka 31: Koncentrace fenolických látek ve vzorku štěpky hrušní v mg/g.	79
Tabulka 32: Antimikrobiální aktivita vodních extraktů listů pocházející z různých odrůd hrušní demonstrována jako průměr inhibiční zóny růstu bakterií [mm].....	83

9. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Zastoupení v plodech a listí ovocných stromů.....	18
Graf 2: Zastoupení organických kyselin v ovocných stromech.....	18
Graf 3: Zastoupení minerálních látek v ovocných stromech.....	19
Graf 4: Zastoupení aminokyselin v ovocných stromech.....	20
Graf 5: Koncentrace fenolických látek v odrůdě 'Topaz' v mg/g.....	55
Graf 6: Koncentrace fenolických látek v odrůdě 'Golden Delicious' v mg/g.....	56
Graf 7: Koncentrace fenolických látek v odrůdě 'Angold' v mg/g.....	57
Graf 8: Koncentrace fenolických látek v odrůdě 'Meteor' v mg/g.....	58
Graf 9: Koncentrace fenolických látek v odrůdě 'Melrose' v mg/g.....	59
Graf 10: Koncentrace fenolických látek v odrůdě 'Fuji' v mg/g.....	60
Graf 11: Koncentrace fenolických látek v odrůdě 'Braeburn' v mg/g.....	61
Graf 12: Koncentrace fenolických látek v odrůdě 'Lady Silvia' v mg/g.....	62
Graf 13: Koncentrace fenolických látek v odrůdě 'Rubinstep' v mg/g.....	63
Graf 14: Koncentrace fenolických látek v odrůdě 'Rubin' v mg/g.....	64
Graf 15: Graf závislosti celkové koncentrace fenolických látek v listí v 10 odrůdách jabloní [mg/g] na daném období.....	66
Graf 16: Koncentrace fenolických látek v odrůdě 'Clapova' v mg/g.....	70
Graf 17: Koncentrace fenolických látek v odrůdě 'Konference' v mg/g.....	71
Graf 18: Koncentrace fenolických látek v odrůdě 'Williamsova červená' v mg/g.....	72
Graf 19: Koncentrace fenolických látek v odrůdě 'Williamsova' v mg/g.....	73
Graf 20: Koncentrace fenolických látek v odrůdě 'Charneuska' v mg/g.....	74

Graf 21: Koncentrace fenolických látek v odrůdě 'Lucasova' v mg/g.....	75
Graf 22: Koncentrace fenolických látek v odrůdě 'Highland' v mg/g.....	76
Graf 23: Koncentrace fenolických látek v odrůdě 'Grosdemange' v mg/g.....	77
Graf 24: Koncentrace fenolických látek v odrůdě 'Thirriotova' v mg/g.	78
Graf 25: Koncentrace fenolických látek v odrůdě 'General Leclerc' v mg/g.	79
Graf 26: Vliv různé teploty na stabilitu směsného standardního roztoku.....	80
Graf 27: Vliv různé teploty vody na extrakt z listí u odrůdy 'Konference'.....	81
Graf 28: Srovnání obsahu fenolických látek v metanolu a horké vodě.	82
Graf 29: Graf závislosti celkové koncentrace fenolických látek v 10 odrůdách hrušní [mg/g] na daném období.	85

10. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BioLib. Dostupné online: <https://www.biolib.cz/> (citace dne 30. duben 2022).
- [2] eAGRI. Dostupné online: <https://eagri.cz/public/app/sok/odrudyNouQF.do> (citace dne 30. duben 2022).
- [3] Nečas, T. Pěstujeme hrušně a kdouloně. Praha: Grada, **2010**. Česká zahrada. ISBN 978-80-247-2500-0.
- [4] Ovocné sady (strukturální šetření), 2017. Český statistický úřad. Ovocné sady (strukturální šetření). Dostupné online: <https://www.czso.cz/csu/czso/statistiky> (citace dne 1. březen 2022).
- [5] Xu, X.; Fountain, M. Integrated management of diseases and insect pests of tree fruit. Cambridge, UK: Burleigh Dodds Science Publishing, **2019**. ISBN 978 1 78676 256 6.
- [6] Mikulic Petkovšek, M.; Stampar, F.; Veberic, R. Increased phenolic content in apple leaves infected with the apple scab pathogen. *J Plant Pathol*, **2008**, *90*, 49-55.
- [7] Kalisz, S.; Oszmiański, J.; Wojdyło, A. Increased content of phenolic compounds in pear leaves after infection by the pear rust pathogen. *Physiol Mol Plant Pathol* **2015**, *91*, 113-119.
- [8] Wojdyło, A.; Nowicka, P.; Turkiewicz, I. P.; Tkacz, K.; Hernandezm F. Comparison of bioactive compounds and health promoting properties of fruits and leaves of apple, pear and quince. *Sci Rep* **2021**,*11*, 20253.
- [9] Jaakola, L.; Määttä-Riihinen, K.; Kärenlampi, S.; Hohtola A. Activation of favonoid biosynthesis by solar radiation in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves. *Planta* **2014**, *218*, 721-728.
- [10] Stoenescu, A. M.; Trandafir, I.; Cosmulescu, S. Determination of Phenolic Compounds Using HPLC-UV Method in Wild Fruit Species. *Horticulturae* **2022**, *8*, 84. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8020084>.
- [11] Saltveit, M. Synthesis and Metabolism of Phenolic Compounds. V knize: Laura, A., Alvarez-Parrilla, E., Gonzales-Aguilar, G.A. Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value, and Stability. 1. vydání, Willey-Blackwell Publishing, **2009**. ISBN 978-0-813-80320-3.
- [12] Herrmann, K. M.; Lisa, M. W. The shikimate pathway. *Annu Rev Plant Physiol* **1999**, *50*, 473-503.
- [13] Buchanan B. B. G. W.; Jones R. L. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. 2. vydání, Willey-Blackwell Publishing, **2015**. ISBN 978-0-470-71421-8.
- [14] Rozmer, Z.; Perjési, P. Naturally occurring chalcones and their biological activities. *Phytochem Rev* **2016**, *15*, 87-120.
- [15] Tsao, R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients* **2010**, *2*, 1231-1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>.

- [16] Lata, B; Trampczynka, A; Paczena, J. Cultivar variation in apple peel and whole fruit phenolic composition. *Sci Hort* **2009**, *121*, 176-181.
- [17] Liaundanskas, M.; Viškelis, P.; Kviklys, D.; Raudonis, R.; Jamulis, V. A. Comparative Study of Phenolic Content in Apple Fruits. *Int J Food Prop* **2015**, *18*, 945-953.
- [18] Alarcón Flores, M. I.; Romero-González, R.; Garrido Frenich, A.; Martínez Vidal, J. L. Analysis of phenolic compounds in olive oil by solid-phase extraction and ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food chem* **2012**, *134*, 2465-2472. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.058>.
- [19] Karaman, S.; Tütem, E.; Başkan, K. S.; Apak, R. Comparison of antioxidant capacity and phenolic composition of peel and flesh of some apple varieties. *J Sci Food Agric* **2013**, *93*, 867-875. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5810>.
- [20] Hilt, P.; Schieber, A.; Yildirim, C.; Arnold, G.; Klaiber, I.; Conrad, J.; Beifuss, U.; Carle, R. Detection of phloridzin in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) by HPLC-PDA-MS/MS and NMR spectroscopy. *J Agric Food Chem* **2003**, *51*, 2896-2899. <https://doi.org/10.1021/jf021115k>.
- [21] Táborský, J.; Sus, J.; Lachman, J.; Šebková, B.; Adamcová, A.; Šatínský, D. Dynamics of Phloridzin and Related Compounds in Four Cultivars of Apple Trees during the Vegetation Period. *Molecules* **2021**, *26*, 3816. <https://doi.org/10.3390/molecules26133816>.
- [22] Górnaś, P.; Mišina, I.; Olšteine, A.; Krasnova, I.; Pugajeva, I.; Lācis, G.; Siger, A.; Michalak, M.; Soliven, A.; Segliņa, D. Phenolic compounds in different fruit parts of crab apple: Dihydrochalcones as promising quality markers of industrial apple pomace by-products. *Ind Crops Prod*, **2015**, *74*, 607-612.
- [23] Rana, S.; Kumar, S.; Rana, A.; Sharma, V.; Katoch, P.; Padwad, Y.; Bhushan, S. Phenolic constituents from apple tree leaves and their in vitro biological activity. *Ind Crop Prod* **2016**, *90*, 118-125. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.06.027>.
- [24] Walia, M.; Kumar, S.; Agnihotri, V. UPLC-PDA quantification of chemical constituents of two different varieties (golden and royal) of apple leaves and their antioxidant activity. *J Sci Food Agric*, **2016**, *96*, 1440-1450.
- [25] Adamcová, A.; Horna, A.; Šatínský, D. Determination of Phloridzin and Other Phenolic Compounds in Apple Tree Leaves, Bark, and Buds Using Liquid Chromatography with Multilayered Column Technology and Evaluation of the Total Antioxidant Activity. *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 244. <https://doi.org/10.3390/ph15020244>.
- [26] Galicia-Garcia, U.; Benito-Vicente, A.; Jebari, S.; Larrea-Sebal, A.; Siddiqi, H.; Uribe, K. B.; Ostolaza, H.; Martín, C. Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*, 6275. <https://doi.org/10.3390/ijms21176275>.
- [27] Beránek, M., Tichý, M. a kol.: Vybrané kapitoly z klinické biochemie. 1. vydání, Praha: Karolinum, **2013**, 197 s., ISBN 978-80-246-2186-9.

- [28] Mudaliar, S.; Polidori, D.; Zambrowicz, B.; Henry, R. R. Sodium-Glucose Cotransporter Inhibitors: Effects on Renal and Intestinal Glucose Transport: From Bench to Bedside. *Diabetes care* **2015**, *38*, 2344-2353. <https://doi.org/10.2337/dc15-0642>.
- [29] Masumoto, S.; Akimoto, Y.; Oike, H.; Kobori, M. Dietary phloridzin reduces blood glucose levels and reverses SglT1 expression in the small intestine in streptozotocin-induced diabetic mice. *J Agric Food Chem* **2009**, *57*, 4651-4656.
- [30] Makarova, E.; Górnaś, P.; Konrade, I.; Tirzite, D.; Cirule, H.; Gulbe, A.; Pugajeva, I.; Seglina, D.; Dambrova, M. Acute anti-hyperglycaemic effects of an unripe apple preparation containing phlorizin in healthy volunteers: a preliminary study. *J Sci Food Agric* **2015**, *95*, 560-568.
- [31] Schulze, C.; Bangert, A.; Kottra, G.; Geillinger, K. E.; Schwanck, B.; Vollert, H.; Blaschek, W.; Daniel, H. Inhibition of the intestinal sodium-coupled glucose transporter 1 (SGLT1) by extracts and polyphenols from apple reduces postprandial blood glucose levels in mice and humans. *Mol Nutr Food Res* **2014**, *58*, 1795-1808. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201400016>.
- [32] Shoji, T.; Yamada, M.; Miura, T.; Nagashima, K.; Ogura, K.; Inagaki, N.; Maeda-Yamamoto, M. Chronic administration of apple polyphenols ameliorates hyperglycaemia in high-normal and borderline subjects: A randomised, placebo-controlled trial. *Diabetes Res Clin Pract* **2017**, *129*, 43-51. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2017.03.028>.
- [33] Jenkins, D. J.; Jenkins, A. L. Dietary fiber and the glycemic response. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. *Proc Soc Exp Biol Med* **1985**, *180*, 422-431. <https://doi.org/10.3181/00379727-180-42199>.
- [34] Zhang, W.; Chen, S.; Fu, H.; Shu, G.; Tang, H.; Zhao, X.; Chen, Y.; Huang, X.; Zhao, L.; Yin, L.; Lv, C.; Lin, J. Hypoglycemic and hypolipidemic activities of phlorizin from *Lithocarpus polystachyus* Rehd in diabetes rats. *Food Sci Nutr* **2021**, *9*, 1989-1996. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2165>.
- [35] Mei, X.; Zhang, X.; Wang, Z.; Gao, Z.; Liu, G.; Hu, H.; Zou, L.; Li, X. Insulin Sensitivity-Enhancing Activity of Phlorizin Is Associated with Lipopolysaccharide Decrease and Gut Microbiota Changes in Obese and Type 2 Diabetes (db/db) Mice. *J Agric Food Chem* **2016**, *64*, 7502-7511. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03474>.
- [36] Shin, S. K.; Cho, S. J.; Jung, U. J.; Ryu, R.; Choi, M. S. Phlorizin Supplementation Attenuates Obesity, Inflammation, and Hyperglycemia in Diet-Induced Obese Mice Fed a High-Fat Diet. *Nutrients* **2016**, *8*, 92. <https://doi.org/10.3390/nu8020092>.
- [37] Shirosaki, M.; Koyama, T.; Yazawa, K. Apple leaf extract as a potential candidate for suppressing postprandial elevation of the blood glucose level. *J Nutr Sci Vitaminol* **2012**, *58*, 63-67. <https://doi.org/10.3177/jnsv.58.63>.
- [38] Khalifa, M.; Bakr, A. G.; Osman, A. T. Protective effects of phloridzin against methotrexate-induced liver toxicity in rats. *Biomed Pharmacother* **2017**, *95*, 529-535. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.08.121>.

- [39] Cai, Q.; Li, B.; Yu, F.; Lu, W.; Zhang, Z.; Yin, M.; Gao, H. Investigation of the Protective Effects of Phlorizin on Diabetic Cardiomyopathy in db/db Mice by Quantitative Proteomics. *J Diabetes Res* **2013**, 2013 263845. <https://doi.org/10.1155/2013/263845>.
- [40] Wang, H.; Sun, Z.; Liu, D.; Li, X.; Rehman, R. U.; Wang, H.; Wu, Z. Apple phlorizin attenuates oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. *J Food Biochem* **2019**, 43, e12744. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12744>.
- [41] Roleira, F. M.; Tavares-da-Silva, E. J.; Varela, C. L.; Costa, S. C.; Silva, T.; Garrido, J.; Borges, F. Plant derived and dietary phenolic antioxidants: anticancer properties. *Food chem* **2015**, 183, 235-258. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.039>.
- [42] Fernando, W.; Coyle, K.; Marcato, P.; Vasantha Rupasinghe, H. P.; Hoskin, D. W. Phloridzin docosahexaenoate, a novel fatty acid ester of a plant polyphenol, inhibits mammary carcinoma cell metastasis. *Cancer letters* **2019**, 465, 68-81. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.08.01>.
- [43] Zhang, X. Y.; Chen, J.; Yi, K.; Peng, L.; Xie, J.; Gou, X.; Peng, T.; Tang, L. Phlorizin ameliorates obesity-associated endotoxemia and insulin resistance in high-fat diet-fed mice by targeting the gut microbiota and intestinal barrier integrity. *Gut microbes* **2020**, 12, 1-18. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1842990>.
- [44] Das S. Natural therapeutics for urinary tract infections-a review. *Futur J Pharm Sci* **2020**, 6, 64. <https://doi.org/10.1186/s43094-020-00086-2>.
- [45] EMEA, 2012. European Medicines Agency. Assessment report on *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng., folium
- [46] Trill, J.; Simpson, C.; Webley, F.; Radford, M.; Stanton, L.; Maishman, T.; Galanopoulou, A.; Flower, A.; Eyles, C.; Willcox, M.; Hay, A.; Griffiths, G.; Little, P.; Lewith, G.; Moore, M. Uva-ursi extract and ibuprofen as alternative treatments of adult female urinary tract infection (ATAFUTI): study protocol for a randomised controlled trial. *Trials* **2017**, 18, 421. <https://doi.org/10.1186/s13063-017-2145-7>.
- [47] Boo, Y. C. Arbutin as a Skin Depigmenting Agent with Antimelanogenic and Antioxidant Properties. *Antioxidants* **2021**, 10, 1129. <https://doi.org/10.3390/antiox10071129>.
- [48] Kamalakkannan, N.; Stanely Mainzen Prince, P. Rutin improves the antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic rat tissues. *Mol Cell Biochem* **2016**, 293, 211-219. <https://doi.org/10.1007/s11010-006-9244-1>.
- [49] Incandela, L.; Cesarone, M. R.; DeSanctis, M. T.; Belcaro, G.; Dugall, M.; Acerbi, G. Treatment of diabetic microangiopathy and edema with HR (Paroven, Venoruton; 0-(beta-hydroxyethyl)-rutosides): a prospective, placebo-controlled, randomized study. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* **2002**, 7, S11-S15. <https://doi.org/10.1177/107424840200700104>.
- [50] Rabišková, M.; Bautzová, T.; Gajdziok, J.; Dvořáčková, K.; Lamprecht, A.; Pellequer, Y.; Spilková, J. Coated chitosan pellets containing rutin intended for the treatment of

inflammatory bowel disease: in vitro characteristics and *in vivo* evaluation. *Int J Pharm* **2012**, *422*, 151-159. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.10.045>.

[51] Alonso-Castro, A. J.; Domínguez, F.; García-Carrancá, A. Rutin exerts antitumor effects on nude mice bearing SW480 tumor. *Arch Med Res* **2013**, *44*, 346-351. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2013.06.002>.

[52] Naveed, M.; Hejazi, V.; Abbas, M.; Kamboh, A. A.; Khan, G. J.; Shumzaid, M.; Ahmad, F.; Babazadeh, D.; FangFang, X.; Modarresi-Ghazani, F.; WenHua, L.; XiaoHui, Z. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomed Pharmacother* **2018**, *97*, 67-74. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.064>.

[53] Kozuma, K.; Tsuchiya, S.; Kohori, J.; Hase, T.; Tokimitsu, I. Antihypertensive effect of green coffee bean extract on mildly hypertensive subjects. *Hypertens Res* **2005**, *28*, 711-718. <https://doi.org/10.1291/hyres.28.711>.

[54] Wang, Z.; Lam, K. L.; Hu, J.; Ge, S.; Zhou, A.; Zheng, B.; Zeng, S.; Lin, S. Chlorogenic acid alleviates obesity and modulates gut microbiota in high-fat-fed mice. *Food Sci Nutr* **2019**, *7*, 579-588. <https://doi.org/10.1002/fsn3.868>.

[55] Chen, J.; Yu, B.; Chen, D.; Zheng, P.; Luo, Y.; Huang, Z.; Luo, J.; Mao, X.; Yu, J.; He, J. Changes of porcine gut microbiota in response to dietary chlorogenic acid supplementation. *Appl Microbiol Biotechnol* **2019**, *103*, 8157-8168. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10025-8>.

[56] Kim, J.; Kim, S.R.; Choi, Y. H.; Shin, J.y.; Kim, C. D.; Kang, N. G.; Park, B. C.; Lee, S. Quercitrin Stimulates Hair Growth with Enhanced Expression of Growth Factors via Activation of MAPK/CREB Signaling Pathway. *Molecules* **2020**, *25*, 4004. <https://doi.org/10.3390/molecules25174004>.

[57] Oh, T. W.; Do, H. J.; Jeon, J. H.; Kim, K. Quercitrin inhibits platelet activation in arterial thrombosis. *Phytomedicine* **2021**, *80*, 153363. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153363>.

[58] Xiong, W.; Yuan, Z.; Wang, T.; Wu, S.; Xiong, Y.; Yao, Y.; Yang, Y.; Wu, H. Quercitrin Attenuates Acetaminophen-Induced Acute Liver Injury by Maintaining Mitochondrial Complex I Activity. *Front Pharmacol* **2021**, *12*, 586010. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.586010>

[59] Wang, L.; Li, Z. W.; Zhang, W.; Xu, R.; Gao, F.; Liu, Y. F.; Li, Y. J. Synthesis, Crystal Structure, and Biological Evaluation of a Series of Phloretin Derivatives. *Molecules* **2014**, *19*, 16447-16457. <https://doi.org/10.3390/molecules191016447>.

[60] Anunciato Casarini, T. P.; Frank, L. A.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S. Dermatological applications of the flavonoid phloretin. *Eur J Pharmacol* **2020**, *889*, 173593. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173593>.

[61] Zhang, Z.; Li, S.; Cao, H.; Shen, P.; Liu, J.; Fu, Y.; Cao, Y.; Zhang, N. The protective role of phloretin against dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice. *Food Funct* **2019**, *10*, 422-431.

- [62] Merck. Dostupné online: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en> (citace dne 6. červenec 2022).
- [63] FoodB. Dostupné online: <https://foodb.ca/> (citace dne 6. červenec 2022).
- [64] Lapornik, B.; Prosek, M.; Golc, W. A. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *J Food Eng* **2005**, *71*, 214-222.
- [65] Proestos, C.; Boziaris, I. S.; Nychas, G. J. E.; Komaitis, M. Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investing ation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chem* **2006**, *95*, 664-671.
- [66] Liu, J.; Ji, F.; Chen, F.; Guo, W.; Yang, M.; Huang, S.; Zhang, F.; Liu, Y. Determination of garlic phenolic compounds using supercritical fluid extraction coupled to supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* **2018**, *159*, 513-523. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.07.020>.
- [67] Nováková, L.; Douša, M. Moderní HPLC separace v teorii a praxi I. 2. přepracované a rozšířené vydání, Brno: Česká chromatografická škola, zapsaný spolek, **2021**. ISBN 978-80-270-8559-0.
- [68] Nacalai USA. Dostupné online: <https://www.nacalaiusa.com/products/view/468/about-core-shell-particles> (citace dne 26.duben 2022).
- [69] Sun, L.; Tao, S.; Zhang, S. Characterization and Quantification of Polyphenols and Triterpenoids in Thinned Young Fruits of Ten Pear Varieties by UPLC-Q TRAP-MS/MS. *Molecules* **2019**, *24*, 159. <https://doi.org/10.3390/molecules24010159>.
- [70] Hartmann, A.; Ganzera, M. Supercritical Fluid Chromatography Theoretical Background and Applications on Natural Products. *Planta med* **2015**, *81*, 1570-1581. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1545911>.
- [71] Desai, P. P.; Patel, N. R.; Sherikar, O. D.; Mehta, P. J. Development and validation of packed column supercritical fluid chromatographic technique for quantification of chlorzoxazone, paracetamol and aceclofenac in their individual and combined dosage forms. *J Chromatogr Sci* **2012**, *50*, 769-774. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bms059>.
- [72] Zhang, Y.; Wu, W. J.; Zhou, W. E.; Ren, Z. Q.; Feng, X. S.; Zhang, F. Determination of 14 heterocyclic aromatic amines in meat products using solid-phase extraction and supercritical fluid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *J Sep Sci* **2020**, *43*, 1372-1381. <https://doi.org/10.1002/jssc.201900816>.
- [73] Montero, L.; Herrero, M.; Ibáñez, E.; Cifuentes, A. Profiling of phenolic compounds from different apple varieties using comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *J Chromatogr A* **2013**, *1313*, 275-283. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.06.015>.
- [74] Nováková, L.; Douša, M. Moderní HPLC separace v teorii a praxi II. 2. přepracované a rozšířené vydání, Brno: Česká chromatografická škola, zapsaný spolek, **2021**. ISBN 978-80-270-8560-6.

- [75] Bulduk, I.; Şahin, M.; Şanlı, S. Arbutin Analysis in Leaves, Fruit and Branches of *Pyrus Anatolica*, Method Optimization. *Eurasian J Anal Chem* **2016**, *11*, 233-244.
- [76] Andreotti, C.; Costa, G.; Treutter, D. Composition of phenolic compounds in pear leaves as affected by genetics, ontogenesis and the environment. *Sci Hort* **2006**, *109*, 130-137.
- [77] Stoenescu, A. M.; Trandafir, I.; Cosmulescu, S. Determination of Phenolic Compounds Using HPLC-UV Method in Wild Fruit Species. *Horticulturae* **2022**, *8*, 84. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8020084>
- [78] Liaudanskas, M.; Viškelis, P.; Raudonis, R.; Kviklys, D.; Uselis, N.; Janulis, V. Phenolic composition and antioxidant activity of *Malus domestica* leaves. *Sci World J* **2014**, 306217 <https://doi.org/10.1155/2014/306217>.
- [79] Sowa, A.; Zgórk, G.; Szykuła, A.; Franciczek, R.; Żbikowska, B.; Gamian, A.; Sroka, Z. Analysis of Polyphenolic Compounds in Extracts from Leaves of Some *Malus domestica* Cultivars: Antiradical and Antimicrobial Analysis of These Extracts. *Biomed Res Int* **2016**, 6705431. <https://doi.org/10.1155/2016/6705431>.
- [80] Asami, D. K.; Hong, Y. J.; Barrett, D. M.; Mitchell, A. E. Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *J Agric Food Chem* **2003**, *51*, 1237-1241. <https://doi.org/10.1021/jf020635c>.
- [81] Alara, O. R.; Abdurahman, N. H.; Ukaegbu, C. I. Extraction of phenolic compounds: A review. *Curr Res Food Sci* **2021**, *4*, 200-214. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.03.011>.
- [82] da Rosa, G. S.; Vanga, S. K.; Garipey, Y.; Raghavan, V. Comparison of microwave, ultrasonic and conventional techniques for extraction of bioactive compounds from olive leaves (*Olea europaea* L.). *Innov Food Sci Emerg Technol* **2019**, *58*, 102234.
- [83] Tyśkiewicz, K.; Konkol, M.; Rój, E. The Application of Supercritical Fluid Extraction in Phenolic Compounds Isolation from Natural Plant Materials. *Molecules* **2018**, *23*, 2625. <https://doi.org/10.3390/molecules23102625>.
- [84] Reátegui, J. L. P.; de Fonesca Machado, A. P.; Barbero, G. F.; Rezende, C. A.; Martínez, J. Extraction of antioxidant compounds from blackberry (*Rubus* sp.) bagasse using supercritical CO₂ assisted by ultrasound. *J Supercrit Fluids* **2014**, *94*, 223-233.
- [85] Wrona, O.; Rafińska, K.; Możeński, C.; Buszewski, B. Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds from Plant Materials. *J AOAC Int* **2017**, *100*, 1624-1635. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0232>.
- [86] Gao, D.; Wang, D. D.; Fu, Q. F.; Wang, L. J.; Zhang, K. L.; Yang, F. Q.; Xia, Z. N. Preparation and evaluation of magnetic molecularly imprinted polymers for the specific enrichment of phloridzin. *Talanta* **2018**, *178*, 299-307. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.09.058>.
- [87] Kindt, M.; Orsini, M. C.; Costantini, B. Improved high-performance liquid chromatography-diode array detection method for the determination of phenolic compounds

in leaves and peels from different apple varieties. *J Chromatogr Sci* **2007**, *45*, 507-514. <https://doi.org/10.1093/chromsci/45.8.507>

[88] ICH. Dostupné online: <https://www.ich.org/page/quality-guidelines> (citace dne 17. března 2022)

[89] Adamcová, Anežka. Stanovení floridzinu a dalších fenolických látek v listech jabloní pomocí HPLC. 2018. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra analytické chemie. Vedoucí práce Šatínský, Dalibor.

[90] Šilhavá, Kristýna. Sledování profilu fenolických látek v různých částech jabloní pomocí HPLC. Hradec Králové, 2021. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra analytické chemie. Vedoucí práce Šatínský, Dalibor.

[91] Šírová, Karolína. Analýza nutričně významných látek v odpadních produktech ovocných stromů pomocí HPLC. Hradec Králové, 2020. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra analytické chemie. Vedoucí práce Šatínský, Dalibor.

[92] Abraham, J.; Diller, K. A. Review of Hot Beverage Temperatures-Satisfying Consumer Preference and Safety. *J Food Sci* **2019**, *84*, 2011-2014. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14699>.

[93] Driscoll, J.A.; Brody, S.L.; Kollef, M.H. The Epidemiology, Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Drugs* **2007**, *67*, 351-368. <https://doi.org/10.2165/00003495-200767030-00003>

11. SEZNAM PUBLIKACÍ, ABSTRAKTŮ A ŘEŠENÝCH PROJEKTŮ

11.1. Přehled publikovaných prací v impaktovaných časopisech

1. Dynamics of phloridzin and related compounds in four cultivars of apple trees during the vegetation period

Jan Táborský, Josef Sus, Jaromír Lachman, Barbora Šebková, **Anežka Adamcová**, Dalibor Šatínský

Molecules 26 (2021) 3816

IF₂₀₂₂ = 4,927

2. Lectin activity in commonly consumed plant-based foods: calling for method harmonization and risk assessment

Anežka Adamcová, Kristian Holst Laursen, Nicolai Zederkopff Ballin

Foods 10 (2021) 2796

IF₂₀₂₂ = 5,561

3. Determination of phloridzin and other phenolic compounds in apple tree leaves, bark, and buds using liquid chromatography with multilayered column technology and evaluation of the total antioxidant activity

Anežka Adamcová, Aleš Horna, Dalibor Šatínský

Pharmaceuticals 15 (2022) 244

IF₂₀₂₂ = 5,215

Práce připravené k odeslání:

Current status of analytical methods for determination of phloridzin, phloretin and other nutraceutical significant phenolic compounds in apples, apple products and apple tree materials

Anežka Adamcová, Jana Kabrhelová, Slavomíra Zatrochová, Marcela Hollá, Dalibor Šatínský

Plánováno do Food Chemistry; Foods

Analysis of arbutin and other phenolic compounds in water extracts from pear leave and the evaluation of antimicrobial activity

Anežka Adamcová, Karolína Šírová, Oto Pavliš, Dalibor Šatínský

Plánováno do International Journal of Molecular Sciences

11.2. Přehled certifikovaných metodik

1. Metodika pro identifikaci a detekci bioaktivních látek v rostlinných částech ovocných stromů a odpadní biomase

Anežka Adamcová, Dalibor Šatínský, Slavomíra Zatrochová, Marcela Hollá, Karolína Šírová, Kristýna Šilhavá, Aneta Bílková, Pavlína Knapová a kolektiv

11.3. Přehled ústních prezentací

1. **Adamcová, A.**, Šatínský, D., Horna, A. Determination of phloridzin and other phenolic compounds in apple leaves, bark and buds by HPLC. 9. Postgraduální a 7. Postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty UK, 23. – 24. 1. 2019, Hradec Králové
2. **Adamcová, A.**, Šatínský, D., Horna, A. Stanovení floridzinu a dalších fenolických látek v odpadních produktech jabloní pomocí HPLC. VITATOX, 20. – 22. 5. 2019, Dvůr Králové nad Labem
3. **Adamcová, A.**, Šírová, K., Šatínský, D. Pear trees material as a rich source of important phenolic compounds. 10. Postgraduální a 8. Postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty UK, 22. – 23. 1. 2020, Hradec Králové
4. **Adamcová, A.**, Šírová, K., Bílková, A., Šatínský, D. Materiál z hrušně jako významný zdroj fenolických látek. VITATOX, 7. – 9. 9. 2020, Dvůr Králové nad Labem
5. **Adamcová, A.**, Šírová, K., Šilhavá, K., Šatínský, D. Determination of phenolic profile in fruit trees during vegetation period. 11. Postgraduální a 9. Postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty UK, 27. – 28. 1. 2021, Hradec Králové
6. **Adamcová, A.**, Šilhavá, K., Šírová, K., Šatínský, D. Ovocné stromy jako významný zdroj fenolických látek; sledování změn v průběhu vegetace. VITATOX, 4. – 6. 10. 2021, Dvůr Králové nad Labem
7. **Adamcová, A.**, Šatínský, D. Hot water as an efficient solvent for extraction of phenolic compounds from plant materials. 12. Postgraduální a 10. Postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty UK, 1. – 2. 2. 2022, Hradec Králové

11.4. Přehled plakátových sdělení prezentovaných na domácích a mezinárodních konferencích

- 1. Adamcová, A., Šatínský, D., Horna, A.** Apple tree materials as a source of important phenolic compounds. Food Chemistry Conference, 17. – 19. 9. 2019, Sevilla. Spain
- 2. Adamcová, A., Šilhavá, K., Šírová, K., Šatínský, D.** Materiál z ovocných stromů jako významný zdroj fenolických látek. CzechFoodChem, 24. – 26. 5. 2021, on – line
- 3. Adamcová, A., Šírová, K., Šilhavá, K., Šatínský, D.** Fruit tree material as a rich source of phenolic compounds. 3rd International Conference on Food Bioactive & Health. 20. – 24. 6. 2022, Parma. Italy.
- 4. Adamcová, A., Laursen, K. H., Ballin N. Z.** Lectin activity in commonly consumed plant-based foods - calling for method harmonization and risk assessment. Recent Advances in Food Analysis. 6. – 9. 9. 2022, Prague. Czech Republic.

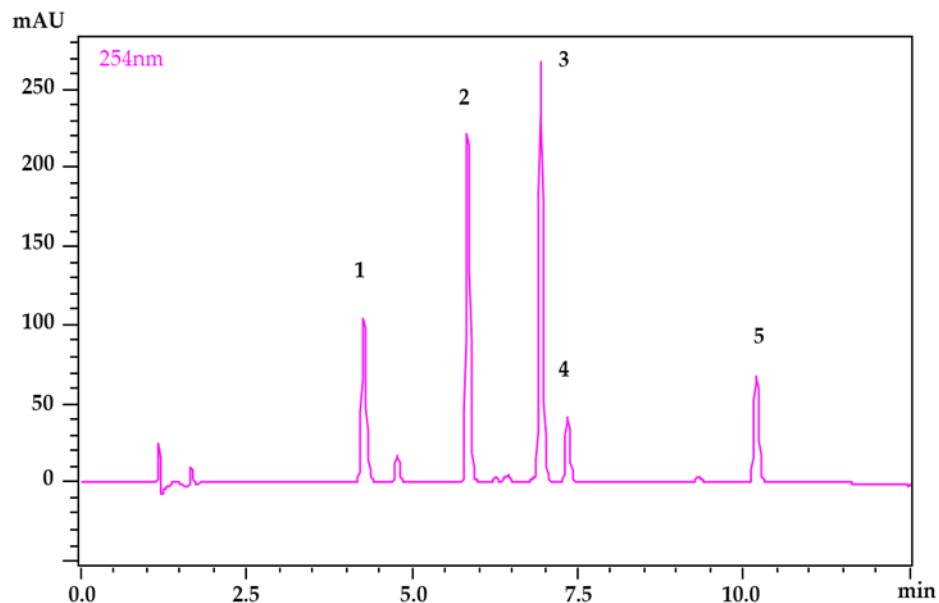
11.5. Přehled řešených projektů

- 1. Vývoj chromatografických metod pro sledování profilu fenolických látek v odpadních produktech ovocných stromů a v ovoci**
(Development of separation methods to monitor the profile of phenolic compounds in unused material of fruit trees and their fruits)
Grantová agentura Univerzity Karlovy, projekt č. 1152120, **hlavní řešitel**
- 2. Výzkum využití odpadů z ovocných stromů jako zdroje cenných bioaktivních látek**
(Research using of fruit tree waste as a source of valuable bioactive substances)
Technologická agentura České republiky, projekt č. TJ02000196, **hlavní řešitel**
- 3. Monitoring prospěšných látek v ovoci a jejich zpracovatelských produktech s ohledem na lidské zdraví a výživu dětí**
(Monitoring of compounds with benefits in fruits and its processed products with respect to the human health and children nutrition)
Technologická agentura České republiky, projekt č. TJ01000151, **spoluřešitel**

12. PŘÍLOHY

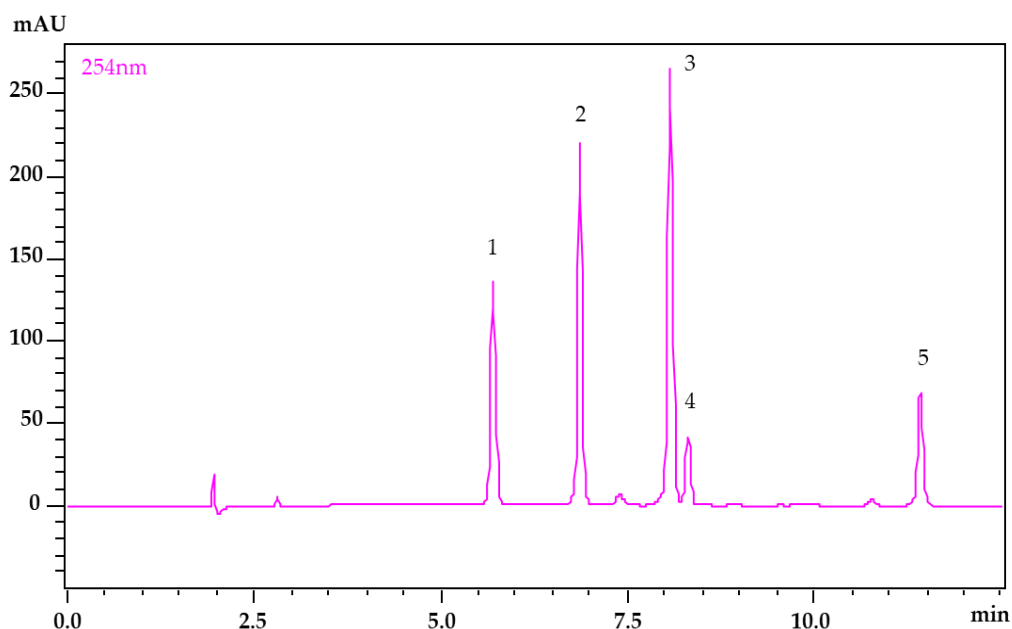
11.1. Chromatogramy směsi standardů na testovaných kolonách při vlnové délce 254 nm

11.1.1. YMC Triart C18 (100 × 4,6 mm, velikost částic 5 μm)



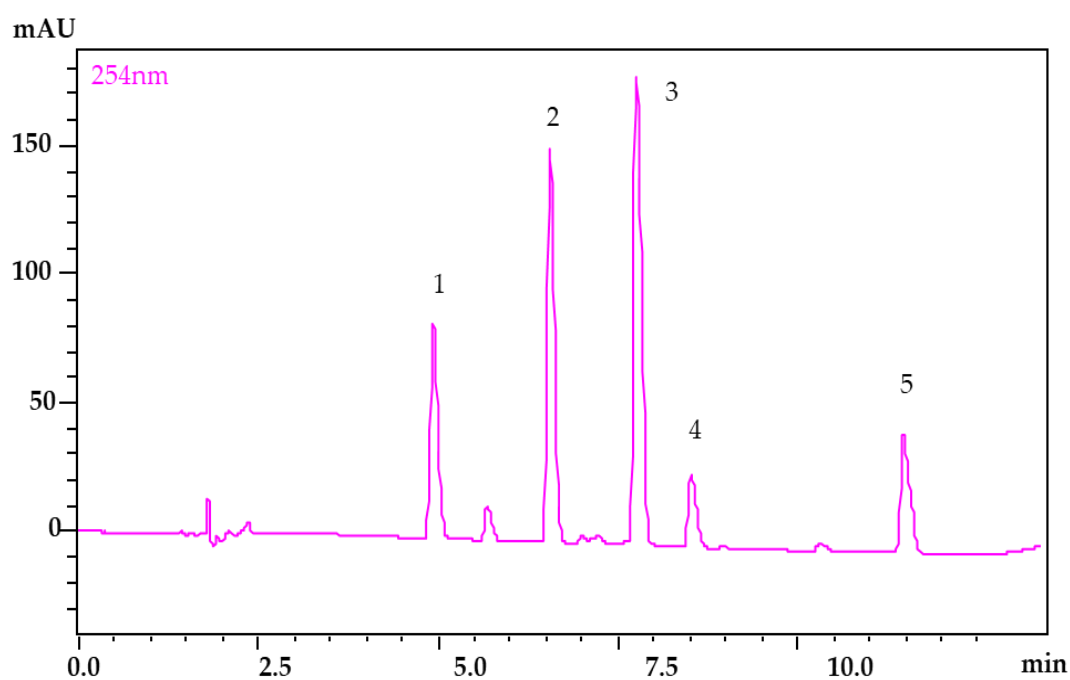
Obrázek S1: Chromatogram směsi standardů. (1) kyselina chlorogenová, (2) rutin, (3) kvercitrin, (4) floridzin, (5) floretin.

11.1.2. YMC Triart PFP plus (150 × 4,6 mm, velikost částic 5 μm)



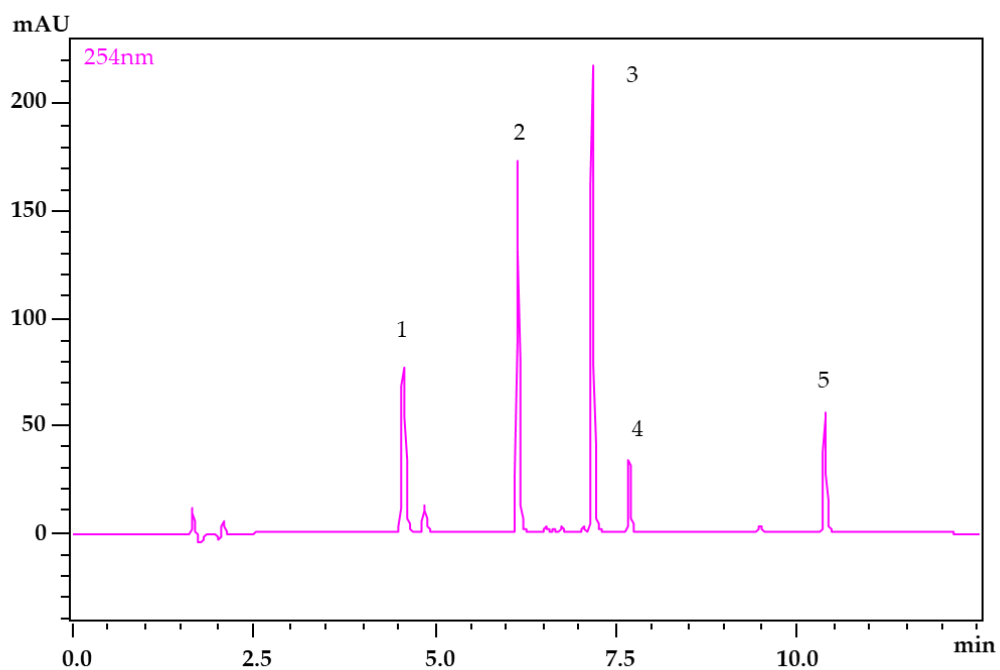
Obrázek S2: Chromatogram směsi standardů. (1) kyselina chlorogenová, (2) rutin, (3) kvercitrin, (4) floridzin, (5) floretin.

11.1.3. Discovery® HS C18 (150 × 4,6 mm, velikost částic 5 μm)



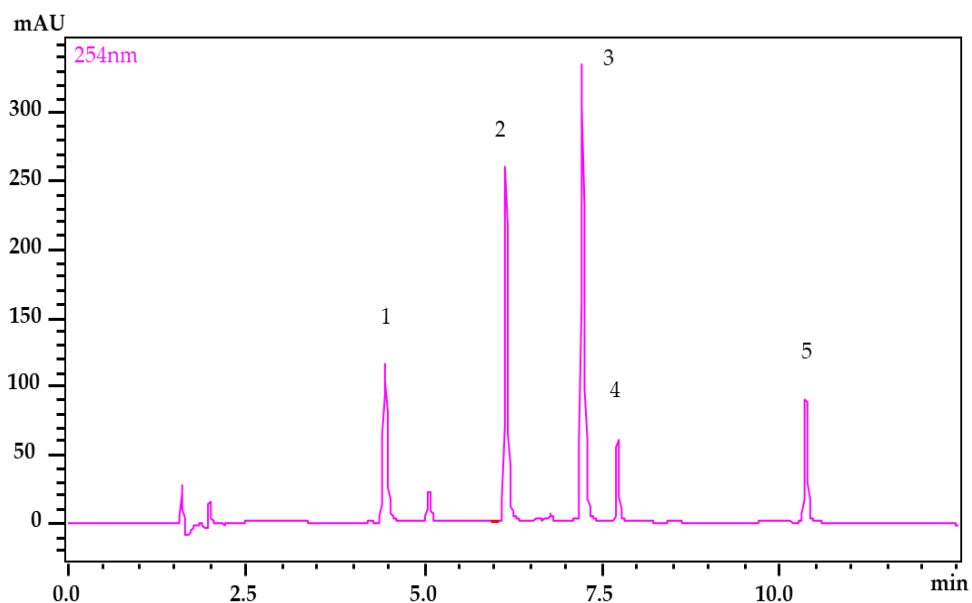
Obrázek S3: Chromatogram směsi standardů. (1) kyselina chlorogenová, (2) rutin, (3) kvercitrin, (4) floridzin, (5) floretin.

11.1.4. Kinetex® F5 100A (150 × 4,6 mm, velikost částic 2,6 μm)



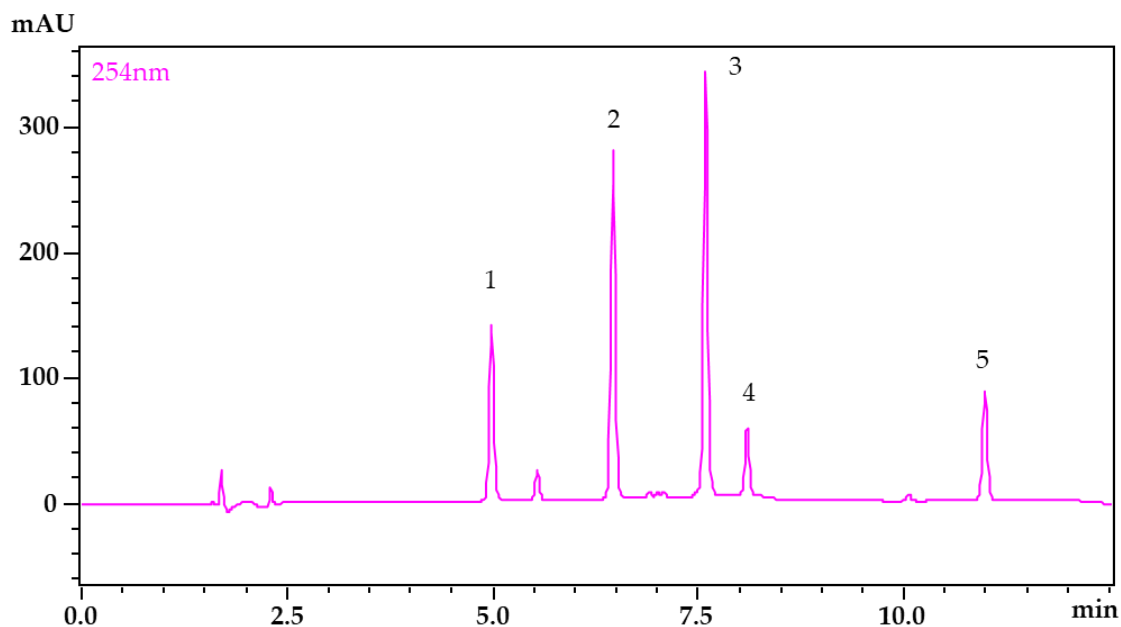
Obrázek S4: Chromatogram směsi standardů. (1) kyselina chlorogenová, (2) rutin, (3) kvercitrin, (4) floridzin, (5) floretin.

11.1.5. Kinetex® C18 100A (150 × 4,6 mm, velikost částic 2,6 μm)



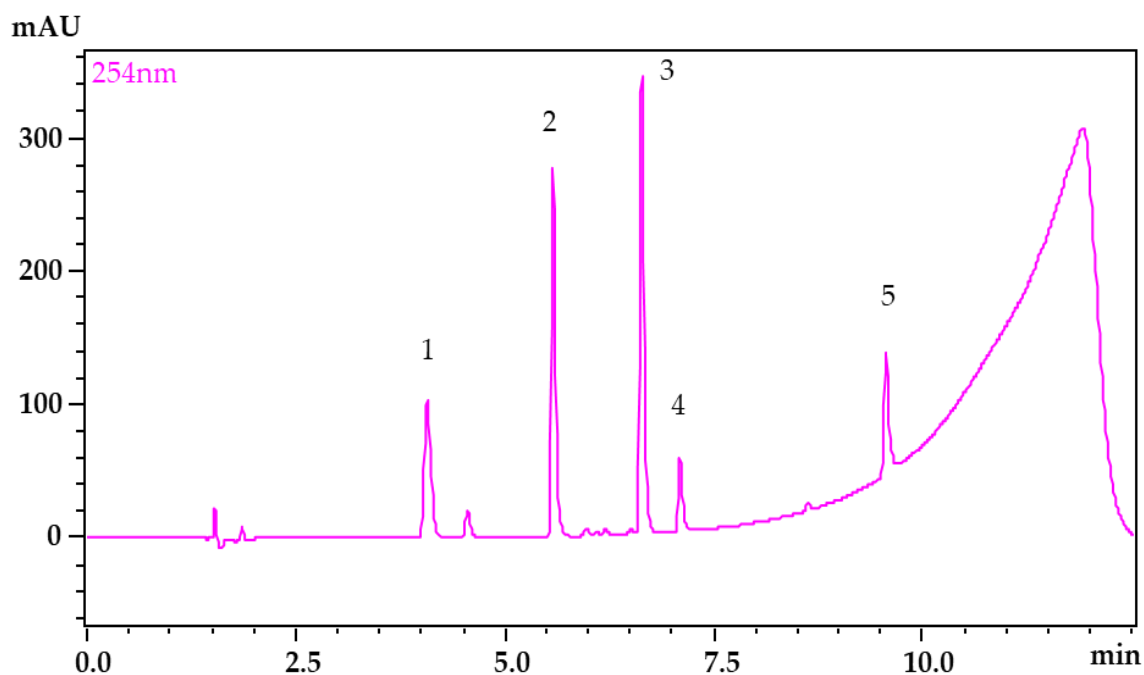
Obrázek S5: Chromatogram směsi standardů. (1) kyselina chlorogenová, (2) rutin, (3) kvercitrin, (4) floridzin, (5) floretin.

11.1.6. Luna Omega Polar C18 (150 × 4,6 mm, velikost částic 5 μm)



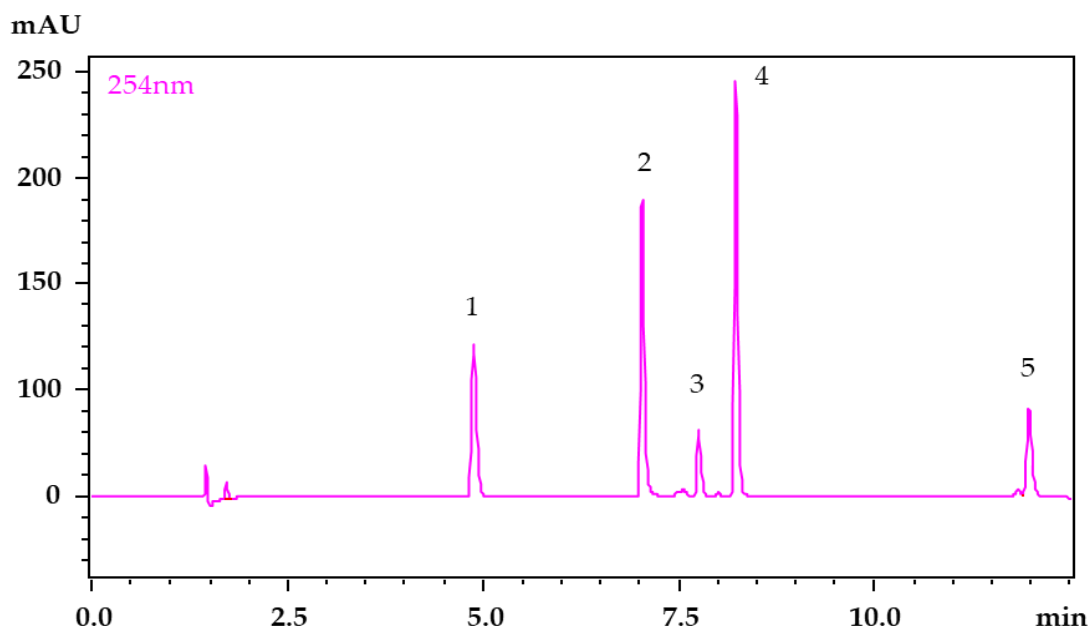
Obrázek S6: Chromatogram směsi standardů. (1) kyselina chlorogenová, (2) rutin, (3) kvercitrin, (4) floridzin, (5) floretin.

11.1.7. Kinetex 100A Biphenyl (150 × 4,6 mm, velikost částic 5 μm)



Obrázek S7: Chromatogram směsi standardů. (1) kyselina chlorogenová, (2) rutin, (3) kvercitrin, (4) floridzin, (5) floretin.

11.1.8. Ascentis Express RP amide (150 × 4,6 mm, velikost částic 2,7 μm)



Obrázek S8: Chromatogram směsi standardů. (1) kyselina chlorogenová, (2) rutin, (3) floridzin, (4) kvercitrin, (5) floretin.

11.2. Parametry testovaných kolon – jablň

Tabulka S1: Parametry chromatografické separace fenolických látek za použití různých kolon.

Kolona	t _R ^a (min)	A _R ^b	R _S ^c	W _{h(5%)} ^d	W _{h(50%)} ^e	P _c ^f	p ^g [MPa]
YMC Triart C18 (100 × 4,6 mm; 5 μm, velikost částic 12 nm)							6,5
Chlorogenová kyselina	4,26	1,22	22,43	0,17	0,08	24	
Rutin	5,83	1,25	11,11	0,15	0,07	34	
Kvercitrin	6,94	1,23	8,10	0,15	0,07	34	
Floridzin	7,34	1,23	2,90	0,15	0,07	42	
Floretin	10,18	1,20	18,99	0,18	0,08	26	
YMC Triart C18 ExRS (150 × 4,6 mm; 5 μm, velikost částic 8 nm)							9,5
Chlorogenová kyselina	4,35	1,15	21,20	0,16	0,07	31	
Rutin	5,76	1,25	10,58	0,14	0,06	38	
Kvercitrin	6,89	1,23	8,82	0,14	0,07	37	
Floridzin	7,45	1,19	4,34	0,14	0,07	40	
Floretin	10,38	1,19	22,23	0,15	0,07	37	
YMC Triart PFP plus (150 × 4,6 mm; 5 μm, velikost částic 12 nm)							6,7
Chlorogenová kyselina	5,66	1,12	26,30	0,16	0,07	28	
Rutin	6,83	1,10	8,46	0,16	0,07	29	
Kvercitrin	8,03	1,09	8,76	0,17	0,07	46	
Floridzin	8,26	1,13	1,68	0,15	0,07	47	
Floretin	11,32	1,10	20,82	0,20	0,08	30	
Discovery HS C18 (150 × 4,6 mm, velikost částic 5 μm)							7,7
Chlorogenová kyselina	4,63	1,41	16,21	0,22	0,11	27	
Rutin	6,14	1,52	7,61	0,20	0,11	34	
Kvercitrin	7,26	1,61	5,49	0,22	0,12	33	
Floridzin	7,97	1,65	3,32	0,22	0,18	35	
Floretin	10,73	1,76	11,81	0,26	0,14	30	
Kinetex F5 100A (150 × 4,6 mm, velikost částic 2,6 μm)							22
Chlorogenová kyselina	4,56	1,34	32,77	0,13	0,06	43	
Rutin	6,14	1,55	11,67	0,10	0,04	43	
Kvercitrin	7,17	1,48	8,37	0,10	0,04	37	
Floridzin	7,68	1,45	5,79	0,10	0,04	57	
Floretin	10,38	1,35	29,17	0,11	0,05	44	
Kinetex C18 100A (150 × 4,6 mm, velikost částic 2,6 μm)							21,5
Chlorogenová kyselina	4,45	1,47	16,11	0,16	0,07	32	
Rutin	4,45	1,47	16,11	0,13	0,07	32	
Kvercitrin	7,23	1,64	10,35	0,13	0,05	39	
Floridzin	7,73	1,42	5,01	0,11	0,05	53	
Floretin	10,37	1,42	26,32	0,13	0,05	53	
Luna Omega Polar (C18 150 × 4,6 mm, velikost částic 5 μm)							6,7
Chlorogenová kyselina	4,98	1,17	27,95	0,14	0,06	37	
Rutin	6,46	1,19	12,78	0,13	0,05	37	
Kvercitrin	7,59	1,15	10,09	0,13	0,06	32	
Floridzin	8,09	1,15	4,34	0,14	0,06	57	
Floretin	10,98	1,08	23,37	0,15	0,07	34	
Kinetex 100A Biphenyl (150 × 4,6 mm, velikost částic 5 μm)							9
Chlorogenová kyselina	4,07	1,24	19,6	0,18	0,09	43	

Rutin	5,57	1,53	11,36	0,13	0,05	56	
Kvercitrin	6,63	1,55	9,68	0,13	0,05	44	
Floridzin	7,10	1,54	4,27	0,13	0,05	58	
Floretin	9,56	1,47	21,62	0,14	0,06	51	
Ascentis Express RP Amide (150 × 4,6 mm, velikost částic 2,7 μm)							19,6
Chlorogenová kyselina	4,88	1,37	29,28	0,16	0,07	43	
Rutin	7,03	1,59	16,98	0,13	0,05	36	
Floridzin	7,76	1,39	6,99	0,11	0,05	58	
Kvercitrin	8,23	1,40	4,65	0,12	0,05	51	
Floretin	11,98	1,28	30,47	0,16	0,07	55	

^a Retenční čas

^b Symetrie píku

^c Rozlišení píku

^d Šířka píku v 5% výšky píku

^e Šířka píku v 50% výšky píku

^f Píková kapacita (počítaná s gradientovou elucí, 12.51 minut)

^g Tlak

11.3. Parametry testované kolony – hrušeň

Tabulka S2: Parametry chromatografické separace za použití kolony Ascentis Express RP Amide (150 × 4,6 mm, velikost částic 2,7 μm)

Kolona	t_R^a (min)	A_s^b	R_s^c	$W_{h[50\%]}^d$	W_h^e [%]	P_c^f	P_g^g [MPa]
Ascentis Express RP Amide (150 × 4,6 mm, velikost částic 2,7 μm)							8,5
Arbutin	2,42	1,32	-	0,10	0,21	56	
Chlorogenová kyselina	5,78	1,52	22,52	0,05	0,11	59	
Rutin	7,33	1,56	16,55	0,05	0,11	56	
Kyselina 3,5-dikafeoylchinová	8,37	-	28,12	0,05	0	45	
Kyselina 1,5-dikafeoylchinová	8,45	-	0,87	0,05	0	45	

^a Retenční čas

^b Symetrie píku

^c Rozlišení píku

^d Šířka píku v 5% výšky píku

^e Šířka píku v 50% výšky píku

^f Píková kapacita (počítaná s gradientovou elucí, 12.51 minut)

^g Tlak