

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

**Fakulta přírodovědecká
Katedra analytické chemie**

**CHARAKTERIZACE PROFILU ANTOKYANINŮ V PLODECH
ROSTLIN RODU LYCIUM METODOU MALDI-MS**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor práce:
Studijní obor:

Radka Mikešová
Chemie pro víceoborové studium –
Biologie

Vedoucí bakalářské práce:
Konzultant:

Mgr. Renáta Myjavcová
Doc. RNDr. Petr Bednář Ph.D.

Olomouc 2011

SOUHRN

V této práci byl studován anthokyaninový profil dvou rostlin a to *Lycium chinense* a *Vaccinium myrtillus*, pomocí hmotnostní spektrometrie s ionizací typu MALDI a hybridním analyzátozem Q-TOF. Plody byly analyzovány na několika úrovních – byly použity dvě extrakční činidla, plod rozdělen na dužinu a slupku, část byla přečištěná za použití SPE techniky a v neposlední řadě byl analyzován přímo plod bez jakékoli předchozí úpravy.

Metanolickeý roztok extrakčního činidla se prokázal jako nejvhodnější. V plodech lycia se podařilo hrubě detekovat 15 antokyaninů, z čehož nejvyšší intenzitu zastoupení měl antokyanidin malvidin a jeho deriváty. U vaccinia bylo detekováno 18 antokyaninů a nejhojněji zastoupený antokyaninový aglykon byl cyanidin. Studiemi potvrzený malvidin a jeho deriváty jako hlavní antokyanin u vaccinia byl v této analýze hrubě detekován jako druhý nejvíce se vyskytující anthokyanin.

Tato práce dále prokázala přítomnost 4 pyranoantokyaninů: 5-methylpyranocyanidin-3-hexoside, 5-methylpyranopeonidin-3-hexosid, 5-methylpyranopetunidin-3-hexosid a 5-methylpyranomalvidin-3-hexosid, jejichž intenzity byly semikvantitativně pozorovány v plodech *Lycium chinense* i *Vaccinium myrtillus*

SUMMARY

The anthocyanins profile of two plants, *Lycium chinense* and *Vaccinium myrtillus*, was studied by Mass spectrometry with MALDI ionization and hybrid analyzer Q-TOF. The fruits were analysed at several levels, two extraction agents were used, the fruit was separated into skin and pulp, one part was purified using SPE technology and finally, the fruit was directly analyzed without previous treatment.

Methanolic extraction solution has been proved such a best extraction agent for anthocyanins. Roughly 15 anthocyanins were detected in lycium, where malvidin together with its derivates represented the highest intensity. In vaccinium, there were detected 18 anthocyanins and the most common anthocyanin aglykone was cyanidin. Studies confirmed malvidin and its derivatives as the major anthocyanins in vaccinium, and malvidin was really rougly detected as the second most abundant anthocyanins in this analysis.

This work also showed the presence of 4 pyranoanthocyanins – 5-methylpyranocyanidin-3-hexoside, 5-methylpyranopeonidin-3-hexoside, 5-methylpyranopetunidin-3-hexoside and 5-methylpyranomalvidin-3-hexosid, the intensity of these were semiquantitatively observed in both *Lycium chinense* and *Vaccinium myrtillus* fruits

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké Fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

Ráda bych na tomto místě poděkovala Mgr. Renátě Myjavcové za vedení mé bakalářské práce, za její podporu, trpělivost, rady a diskuze, nejen při vytváření této práce.

Dále bych poděkovala Doc. RNDr. Petru Bednářovi Ph.D. za nabídku se tímto tématem zabývat.

A nakonec bych chtěla poděkovat svému dědečkovi Zdeňku Mikešovi za jeho celoživotní lásku k rostlinám, podporu své vnučky, za poskytnutí nápadu na rostlinu a za péči o ni v době mé nepřítomnosti.

OBSAH

	Strana
1. ÚVOD	1
2. TEORETICKÁ ČÁST	2
2.1 Flavonoidy	2
2.1.1 Charakteristika	2
2.1.2 Význam	2
2.1.3 Chemie flavonoidů	3
2.1.4 Cukerná složka	4
2.1.5 Antokyaniny	5
2.1.5.1 Chemická struktura	5
2.1.5.2 Anthokyanidiny	6
2.1.5.3 Cukerná složka	7
2.1.5.4 Biosyntéza	7
2.1.5.5 Barva	8
2.1.5.6 Funkce	8
2.2 Rod Lycium	9
2.2.1 Úvod	9
2.2.2 Výskyt	10
2.2.3 Charakteristika	10
2.2.4 Pojmenování	10
2.2.5 Význam	11
2.2.6 Léčebné účinky	11
2.3 Rod Vaccinium	13
2.4 Techniky úpravy rostlinného materiálu Solid-phase extraction (SPE)	13
2.4.1 Princip	13
2.4.2 Využití	14
2.4.3 Postup	14
2.5 Metody používané k analýze flavonoidů	15
2.5.1 Hmotnostní spektrometrie	15
2.5.1.1 Princip	15
2.5.1.2 Instrumentace	16
2.5.1.2.1 Iontový zdroj	16
2.5.1.2.2 Hmotnostní analyzátor	17
2.5.1.2.3 Detektory	18
2.5.2 MALDI/MS	19
2.5.2.1 Matrice	19
2.5.2.2 Průběh analýzy	20
2.5.2.3 Využití	21
2.5.3 LC, LC/MS	22
2.5.3.1 Využití	22
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
3.1 Chemikálie	24
3.2 Příprava extrakčního činidla	24
3.3 Příprava vzorku Lycium chinense a Vaccinium myrtillus	24
3.4 Příprava matrice pro MALDI-MS-TOF	25

3.5 Příprava spotů na destičce pro MALDI-MS-TOF	25
3.6 Přístroje a vybavení	25
3.7 Postupy vyhodnocení	26
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	27
4.1 Analýza antokyaninů pomocí MS	27
4.1.1 Extrakční činidlo	29
4.1.2 Antokyaniny v analyzovaných plodech.....	30
4.1.2.1 Lycium	30
4.1.2.2 Vaccinium	32
4.2 Antokyaniny v analyzovaných pevných částech plodů	34
4.3 Použití SPE techniky	38
4.4 Pyranoantokyaniny	40
5. ZÁVĚR	43
6. LITERATURA	44
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	50

1. ÚVOD

Antokyaniny jsou rostlinné pigmenty, jenž patří do skupiny flavonoidních rostlinných fenolů a patří mezi z nevýznamnější barviva v rostlinách. Jejich významnou vlastností jsou, mnohokrát potvrzené, antioxidační účinky, ale i jiné důležité funkce pro rostliny i lidstvo.

V předkládané práci byla studována přítomnost těchto látek v *Lycium chinense* a *Vaccinium myrtillus* pomocí hmotnostního spektrometru s ionizací MALDI a hybridním analyzátozem typu Q-TOF.

Kustovnice čínská, *Lycium chinense* Mill., z čeledi lilkovitých (Solanaceae), jenž byla popsána na konci 18. století Philipem Millerem. Patří mezi léčivé rostliny čínské tradiční medicíny po dobu skoro 2000 let a v posledních letech se dostává do našich zahrad, kuchyní i léčiv. Léčivé účinky a aktivní látky této rostliny byly potvrzeny v mnoha studiích, stejně jako přítomnost některých flavonoidů, ale přítomnost antokyaninů v této v tomto druhu rostliny prozatím potvrzena nebyla.

Oba plody byly analyzovány na několika úrovních, neboť byly rozděleny na dužinu a slupku, extahovány ve dvou extrakčních činidlech a část byla přečištěná pomocí Strata SPE kolonek. V neposlední řadě byl přímo analyzován kus slupky a část dužiny, jako pevné části obou plodů.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Flavonoidy

2.1.1 Charakteristika

Flavonoidy jsou sekundární metabolity rostlin. Odhaduje se, že asi 2% uhlíku, které vzniknou fotosyntézou je přeměněno na flavonoidy. Vyskytují se ve všech částech rostliny, kde tvoří barevné pigmenty. Chrání rostliny před UV zářením a útoky hmyzem, jsou zapojeny do fotosenzibilizace, přenosu energie, morfogeneze rostliny a určení pohlaví, fotosyntézy a funkce hormonů v rostlině.¹

Flavonoidům jsou přiřítány klíčové funkce v růstu a rozvoji rostlin, jako například opylování a šíření semen díky pigmentaci, stimulace bakterií *Rhizobium* pro fixaci dusíku, růst pylové láčky a resorbce minerálních živin z opadavých listů. Dále zvyšují toleranci k abiotickým stresorům, tvoří základ pro alelopatické interakce s jinými druhy rostlin.²

V uplynulém desetiletí došlo k rozvoji molekulární biologie, analytických technik ve spojení s velkým zájmem o antokyaniny, jakož potenciální výživové doplňky pro lidstvo.²

2.1.2 Význam

Tyto látky mají antioxidační účinky. Dále jsou schopny odstranit oxid dusný, který v kombinaci s volnými radikály tvoří škodlivý peroxynitrit. Používají se k prevenci proti rakovině, demenci, arteroskleróze, koronárním srdečním onemocněním a připisuje se jim mnoho dalších biologických aktivit jako jsou antivirové, antimikrobiální, antialergické a také působí proti křečím a vředům.¹

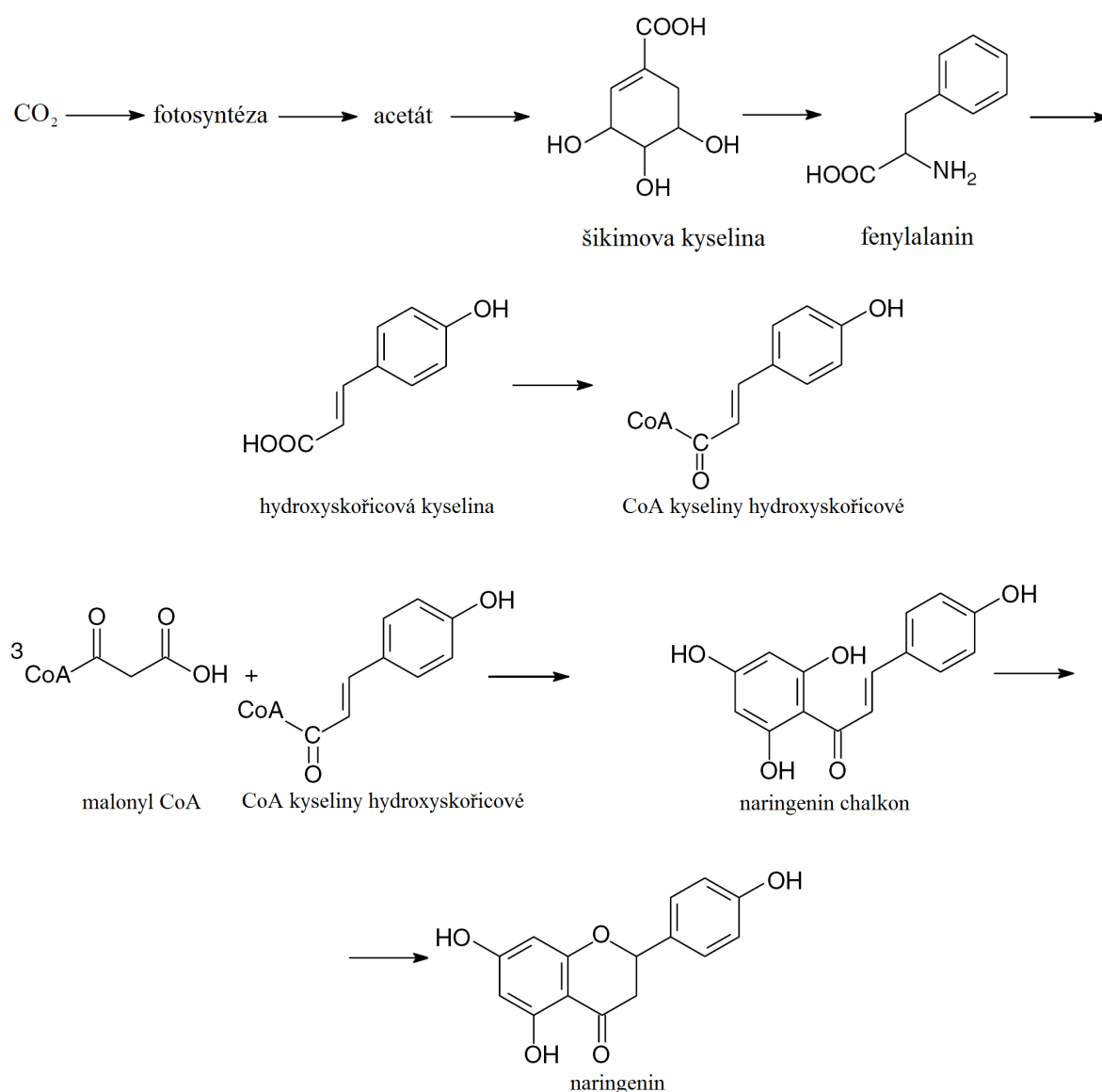
Hlavním zdrojem flavonoidů v potravě je ovoce a nápoje, jako ovocné šťávy, červené víno, čaj, káva, pivo, také bylinky a zelenina.¹

2.1.3 Chemie flavonoidů

Flavonoidy vznikají sérií kondenzačních reakcí mezi hydroxyskořicovou kyselinou, která tvoří kruh B a 2, 3 a 4 uhlík v kruhu C a dále malonyl CoA, který tvoří A kruh. Cyklizací dojde ke vzniku třetího kruhu, označovaného C.¹

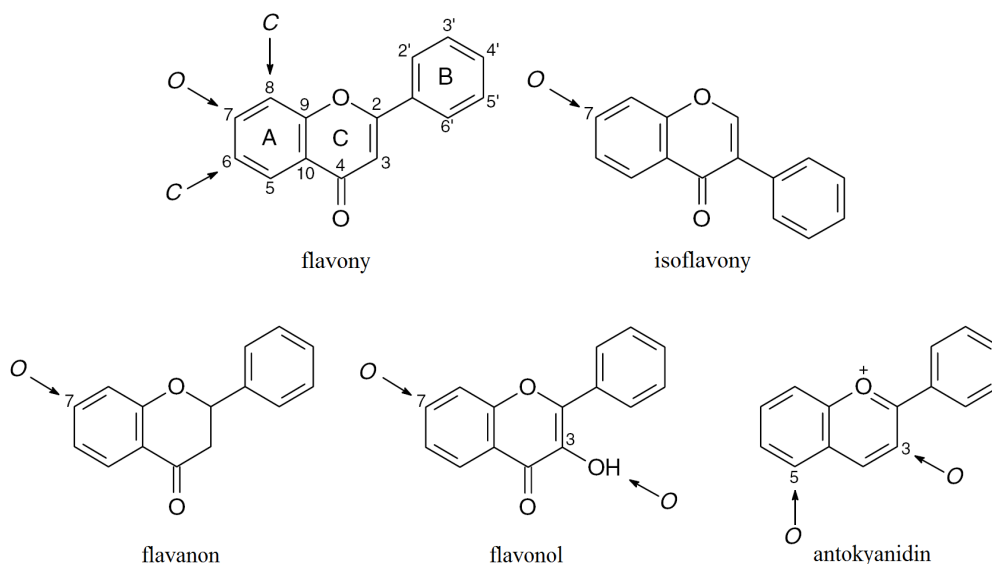
Následující schéma I znázorňuje postup biosyntézy flavonoidů. Důležitou reakcí se fotosyntéza, neboť již vzniká následnými postupy acetát a z něj jak kyselina hydroxyskořicová, tak i malonyl CoA, jejichž syntézou vzniká chalkon.³

Schéma I Biosyntéza flavonoidů^{1,3}



Podle cyklizace, stupně nasycenosti a oxidace tří-uhlíkových segmentů můžeme flavonoidy rozdělit do několika následujících základních tříd.¹

Obr. 1 Třídy flavonoidů¹



V současné době je známo asi 400 druhů flavonů, 300 isoflavonů, 350 flavanonů, 450 flavonolů a 19 antokyanidinů. Flavonoidy se běžně vyskytují v různých formách, kdy mohou být hydroxylovány, metylovány, ale hlavně glykosylovány. K flavonoidům nebo jejich cukrům se mohou připojit aromatické a mastné kyseliny, sulfid, prenyl, metylendioxin nebo isoprenyl.¹

2.1.4 Cukerná složka

Flavonoidy se běžně vyskytují jako O-glykosidy, kde na jednu nebo více hydroxylových skupin aglykonu se váže cukr, čímž vznikne O-C vazba. Navázaný cukr způsobuje snížení reaktivity molekuly a zvýšení rozpustnosti ve vodě, glykosylace tedy umožňuje bezpečně ukládat flavonoidy ve vakuole buňky. Obr. 1 ukazuje typická místa pro glykosylace tříd flavonoidů. Nejčastěji navázaná cukerná složka je glukóza, dále pak galaktóza, rhamnóza, arabinóza a xylóza. Typické jsou i disacharidy, dále trisacharidy a

někdy i tetrasacharidy. Ke glykosylaci může dojít přímo na molekule aglykonu, tedy na flavonoidním jádře, kdy dochází k vazbě C-C a vznikají C-glykosidy.¹

2.1.5 Antokyaniny

Sloučeniny, jenž se často v českém jazyce označují jako ant(h)okyany nebo anthokyaniny.⁴ Své jméno dostaly z řečtiny, kde *anthos* znamená květ a *kyanos* modrou barvu.⁵

Jsou to rostlinné pigmenty, které jsou rozpustné ve vodě a jsou nositeli barevnosti různých druhů a částí rostlin. Řadí se mezi flavonoidy nebo-li flavonoidní rostlinné fenoly⁴ a patří mezi nejvýznamnější skupinu viditelných rostlinných barviv hned po chlorofylu.⁵ Mohou se vyskytovat v barvě od lososově růžové přes červenou a fialovou až po tmavě modrou.²

Antokyaniny částečně absorbují ve viditelné části spektra a tvoří širokou škálu barev od tmavě modrých a fialových přes červené a růžové až po oranžové odstíny.⁴ Jsou přítomné v rostlinných tkáních jako květ, plod, listy, ale i kořeny a hlízy krytosemenných rostlin, najdeme je také u nahosemenných rostlin, kapradin a mechorostů.²

2.1.5.1 Chemická struktura

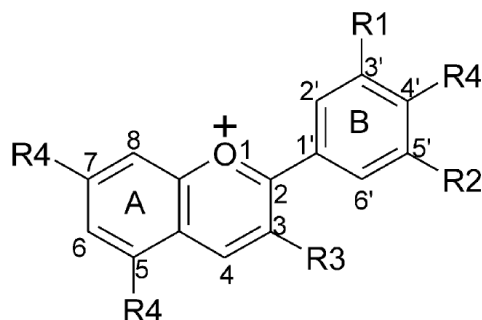
Celkový počet různých druhů antokyaninů, jenž byly izolovány z rostlin, je přibližně 500.² Přirozeně se vyskytující antokyaniny jsou heteroglykosidy, které se skládají z cukerné složky a aglykonu. Aglykon jako necukerná část se nazývá antokyanidin.⁴

Rozdíl mezi jednotlivými antokyaniny je v počtu hydroxylových skupin, typu a počtu cukrů a typu a množství alifatických nebo aromatických kyselin, které jsou spojeny s cukry acylací.⁵

Většina antokyaninů vykazuje nestabilitu k množství chemických látek a fyzikálním parametrům, včetně kyslíku, vysoké teplotě, pH a jiné. Často se vyskytují ve složitých směsích, které je těžké izolovat.²

2.1.5.2 Antokyanidiny

Antokyanidiny jsou polyhydroxyderiváty a polymethoxyderiváty 2-fenylbenzopyryliového kationtu, také zvaného flavyliový kation.⁵



Obr.2 Flavyliový kation,

R1 a R2 jsou H, OH nebo OCH₃,

R3 je H nebo cukerná složka,

R4 je OH nebo cukerná složka⁵

V přírodě existuje 17 významných antokyanidinů, kde všechny jsou v poloze C-4' substituovány hydroxylovou skupinou. Dále se pak vzájemně liší v polohách C-3, C-5, C-6, C-7, C-3' a C-5'. (Obr. 2, Tab. I).

Tab. I Přehled anthokyanidinů⁵

Název	Zkratka	Možné substituenty							Barva
		3	5	6	7	3'	4'	5'	
Apigeninidin	Ap	H	OH	H	OH	H	OH	H	oranžová
Aurantininidin	Au	OH	OH	OH	OH	H	OH	H	oranžová
Capensininidin	Cp	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OMe	modro-červená
Cyanidin	Cy	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	oranžovo-červená
Delphinidin	Dp	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	modro-červená
Europininidin	Eu	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OH	modro-červená
Hirsutidin	Hs	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	OMe	modro-červená
6-Hydroxycyanidin	6OHCy	OH	OH	OH	OH	OH	OH	H	červená
Luteolinidin	Lt	H	OH	H	OH	OH	OH	H	oranžová
Malvidin	Mv	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OMe	modro-červená
5-Methylcyanidin	5-MCy	OH	OMe	H	OH	OH	OH	H	oranžovo-červená
Pelargonidin	Pg	OH	OH	H	OH	H	OH	H	oranžová
Peonidin	Pn	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H	oranžovo-červená
Petunidin	Pt	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH	modro-červená
Pulchellidin	Pl	OH	OMe	H	OH	OH	OH	OH	modro-červená
Rosininidin	Rs	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	H	červená
Tricetinidin	Tr	H	OH	H	OH	OH	OH	OH	červená

Pouze 6 antokyanidinů se běžně vyskytuje ve vyšších rostlinách a mají potravinářský význam, podle četnosti výskytu v jedlých částech rostliny je to cyanidin, podle latinského názvu chrpy – *Cyanus*, pelargonidin, podle pelargonie – *Pelargonium*, peonidin, pivoňky – *Paeonie*, delfinidin, podle stračky – *Delphinium*, petunidin, petunie – *Petunia* a malvidin, podle slézu – *Malva*.^{4,5} 97% ze všech antokyaninů je známo v glykosylované podobě. 3-desoxyantocyanidin, sphagnorubin a rosacyanin B byly identifikovány v rostlině jako aglykony.²

2.1.5.3 Cukerná složka

Většina antokyaninů obsahuje jednu, dvě nebo tři cukerné jednotky. Ternatin A1 a cyanodelphin jich však obsahují i sedm.²

V přírodě jsou anthokyanidiny glykosylovány vždy v poloze C-3, cukerná složka v podobě monosacharidů je zejména D-glukóza, L-rhamnóza, D-galaktóza, D-xylóza, L-arabinóza nebo kyselina glukuronová, a disacharidů je hlavně rutinóza, sambubióza, gentiobióza, robinobióza, lathyróza, neohesperidóza, laminariobióza nebo soforóza.^{2,4}

Antokyanidiny jsou obecně méně stabilní i rozpustné než antokyaniny, glykosylace antokyanidinu se považuje za příspěvek k stabilizaci a rozpustnosti molekuly jako u flavonoidů. Z toho vyplývá, že ztráta cukerné složky je tedy doprovázena rychlým rozkladem aglykonu a nevratnou ztrátou barvy. Dalším místem ke glykosylaci je často poloha C-5 a méně často C-7, C-3' a C-5'. Podle počtu navázaných cukrů rozlišujeme monoglykosidy, diglykosidy a triglykosidy, tetrasacharidové jednotky ještě nebyly nalezeny.^{2,4}

Cukerné jednotky se u antokyaninů váží přes hydroxylové skupiny a vznikají tedy O-glykosidy. V poslední době byl však izolován i první přírodní C-glykosylantokyanin z *Tricyrtis formosana*.²

2.1.5.4 Biosyntéza

Syntéza antokyanidinů může probíhat dvojitým způsobem. Jeden způsob je kondenzace 2-hydroxybenzaldehydu a acetofenonu a druhá předpokládá přeměnu některého z

typu flavonoidů, kdy po vzniku naringeninů (Obr. 2) dochází k oxidaci enzymem flavonoidní hydroxylázou a dochází také k připojení cukerné části, což zajišťuje UDP-O-glukosyl transferáza.² Více než pět enzymů je povinno takto syntetizovat antokyaniny a všechny pracují součinně. I malé narušení v tomto mechanismu, genetické nebo vnější, může způsobit zastavení výroby antokyaninů.³

2.1.5.5 Barva

Absorpční maxima aglykonů mají vyšší hodnoty než monoglykosidy a ty než diglykosidy, což znamená, že aglykony jsou modřejší a s glykosilací narůstá červený odstín. Acylace cukru posouvá barvu do oranžova, ale je méně rozhodující. Barevný tón antokyaninů souvisí také s fyzikálně-chemickými a chemickými ději v prostředí. Zvýšený počet hydroxylovaných skupin v kruhu B u anthokyanidinů způsobuje namodralý odstín a více methoxylových skupin posouvá odstín do barvy červené.⁴

2.1.5.6 Funkce

Nejdůležitější funkcí antokyaninů pro rostliny je schopnost zbarvení rostliny nebo jejich produktů. Barva rostlin poté hraje důležitou roli v jejich rozmnožování, neboť následkem barevnosti je přitažlivost pro hmyz nebo zvěř, tímto dochází k opylování a rozšiřování semen.⁵

Studie tvrdí, že antokyaniny se hromadí v mladých a podzimních listech, v reakci na nedostatek živin, změnu teploty nebo UV záření, což se spojuje s ochranou před poškozením býložravci nebo houbovou infekcí. Antokyaniny přispívají rostlinám k osmóze.²

Tyto látky dokáží tělo zbavovat reaktivních kyslíkových radikálů, inhibovat oxidaci lipoproteinů a tedy mají antioxidační účinky.⁵ Výzkumy dále poukazují, že antokyaniny mohou být prospěšné pro zvrácení průběhu neurálního stárnutí.⁶

V roce 1998 bylo publikováno, že antokyaniny z červeného vína mohou potlačit růst nádorových buněk lidské rakoviny tlustého střeva nebo žaludku. V tom samém roce studie ukázala, že anthokyaniny získané z *H. Rosasynensis* mohou mít pozitivní obranné účinky proti tetrachlormethanu, který se jeví méně hepatotoxicky. O 2 roky později byl prokázán účinek antokyaninů z červeného vína Cabernet na průběh a intenzitu symptomů

experimentální cukrovky u potkanů, kdy díky podávání antokyaninů došlo k poklesu koncentrace cukru v moči a krvi. Přírodní antokyaniny mohou být užitečné při kontrole oxidačního stresu v průběhu těhotenství, které je komplikováno intrauterinní růstovou retardací. V roce 2001 se zjistilo, že cyanidin a delphinidin, mají schopnost inhibovat růst lidských nádorových buněk in vitro v mikromolárním rozsahu a o rok později, že mají silné inhibiční účinky na produkci oxidu dusného. Objevují se i zprávy o tom, že antokyaniny jsou účinné proti vředům nebo poskytují ochranu proti UV záření.⁵

Dále mohou interagovat s DNA, cyanidin tvoří s DNA komplexy a tím chrání DNA před poškozením oxidací a absorbuje zelené světlo, čímž chrání chloroplast od účinků UV záření.^{2,5}

Antokyaniny jsou přídatná potravinářská barviva, která mají index E163 a jsou všeobecně považována za zdraví nezávadná.⁷ Hlavními zdroji antokyaninů v jedlých rostlinách jsou čeledi Vitaceae – hroznové víno a Rosaceae - třešně, švestky, maliny, jahody, ostružiny, jablko, broskev a jiné.⁸

2.2. Rod Lycium

2.2.1 Úvod

Lycium chinense, česky Kustovnice čínská, je rostlina z čeledi *Solanaceae*, tedy lilkovité (Obr. 3). V Čínské kultuře se rostlina používá jako potrava, dochucovadlo, pochutina nebo léčivo již 2000 let.⁹

Plodům této rostliny se říká červené diamanty, neboť jsou po staletí pokládány ve starověkých čínských lékařských knihách jako jedny z výživných a ozdravujících rostlin.¹⁰



Obr. 3 Plod a květ *Lycium chinense*

2.2.2 Výskyt

Přírozně se vyskytuje zejména v Asii, konkrétně v severozápadní Číně, Mongolsku a také Tibetu. Lycium je intenzivně pěstováno v čínské provincii Ningxia, což je malá autonomní oblast, kde byla produkce této rostliny zahájena již 1987.¹¹

2.2.3 Charakteristika

Je to keř, 1-2 metry velký. Původní výskyt je ve východní Asii. Dnes ji nacházíme v mírných a subtropických pásmech celého světa.¹² Pro pěstování není třeba bohaté půdy, stačí středně kvalitní, vyžaduje však slunnou oblast. Rostlina je velmi odolná a vydrží teploty mezi 0-23 °C.⁹

Lycium patří mezi dřeviny s opadavými listy. Ty jsou uspořádány na stonku střídavě nebo ve svazku po třech a jsou buď kopinaté nebo vejčité, 70mm dlouhé. Květy rostou po jednom nebo po třech, jsou heterochlamydní a oboupohlavné, jsou opylovány včelami.^{9,13} Koruna mívá bílou nebo světle fialovou barvu. Na severní polokouli kvete od června do září a plody zrají od srpna do října, konkrétně to závisí na zeměpisné šířce, nadmořské výšce a klimatu. Plodem je oranžovo-červená bobule, 10-20 mm dlouhá, která obsahuje 10-60 žlutých malých semen.

Rozdíl mezi podobnými druhy rodu Lycium, *Lycium barbarum* a *Lycium chinense*, je v místě výskytu a velikosti. *Lycium chinense* (Obr. 4) se vyskytuje na jihu Číny a je menší.¹³ *Lycium chinense* byla vybrána na analýzu, neboť právě tento druh se prodává jako sušený produkt pod názvem Goji, jenž by měl mít mnoho zdraví prospěšných účinků.

2.2.4 Pojmenování

Lycium má několik názvů. Čínsky se lycium nazývá „gouqi“, anglicky mluvící země používají název čínská wolfberry, tedy volně přeloženo čínské vlčí bobule, zřejmě proto, že „gou“ znamená pes nebo vlk.¹¹ Komerčně se tato rostlina prodává právě pod názvem Goji jako sušená nebo jako Goji berry v podobě malého keříku (Obr. 4).

Carl Linné pojmenoval tuto rostlinu v roce 1753 rodem *Lycium* a později nazval rostlinu i druhovým názvem *Lycium barbarum*. Po 15 letech pojmenoval a popsal botanik

Philip Miller další druh, *Lycium chinense*. Dále ji najdeme pod názvem boxthorn, což znamená rod *Lycium*, používaný pro oba druhy.^{9,11}



Obr. 4 Komerčně prodávané sušené plody Goji

2.2.5 Význam

Lycium bylo poprvé popsáno v roce 100 n.l. Šen-nung Bencao Jingem a čínští lékaři jej používali na mnoho chorob nebo k jejich předcházení. Mezi její údajné léčebné účinky patří výživa krve, ledvin, jater, plic, používá se při nemocech doprovázejících žížen, jako tuberkulóza a cukrovka. Je známá jako lidový lék, který pomáhá k dlouhověkosti a dobrému zraku.¹¹

Z rostliny se využívají plody ať už syrové, vařené nebo sušené, které mají nasládlou příchuť. Dále také listy nebo mladé výhonky, které se také mohou konzumovat vařené nebo syrové. Pražený plod se používá jako náhražka kávy a sušené listy této rostliny jako čaj.⁹

2.2.6 Léčebné účinky

Lycium má antioxidační účinky, čímž snižuje poškození DNA, peroxidaci lipidů a celkově zvyšuje buněčnou životaschopnost u jaterních buněk vystavených peroxidům před apoptozou.^{14, 15, 16} Dále působí proti kardiovaskulárním onemocněním.¹⁷

Nejvíce je využíván plod samotný. Jeho odvar se používá k posílení ledvin, jater a obnovení spermatu, pomáhá tedy v řešení sexuálních poruch a plodnosti. Dále chrání játra

před toxiny a v poslední době se provádějí výzkumy, zda se nejedná o potravinu schopnou snížit výskyt rakoviny.¹³

Kořenová kůra má antibakteriální a protihorečnaté účinky, dále hypoglykémické účinky, čímž snižuje hladinu cukru v krvi a také vasodilatační, kdy rozšiřuje cévy a snižuje krevní tlak. Glukopyranosid a fenolické aminy, které byly izolovány z kořene inhibují lidské patogenní bakterie a houby.¹³ Kořen se používá při léčbě plicní tuberkulózy a zápalu plic, při chronických horečnatých onemocněních, nočním pocení, kašelu a astma, tuberkulózy, vysokém krevním tlaku a cukrovce.⁹

Listy jsou bohaté na vitamín A a obsahují asi 3,9% bílkovin, 2,3% sacharidů, 0,7% tuku.¹ Listy lycia byly podávány v podobě prášku obézním potkanům, následkem tohoto „prášku“ došlo k snížení hladiny triglycerolů a cholesterolu, a tedy i k celkovému snížení hmotnosti sledovaných potkanů.¹⁶

Semeno plodu se používá jako hemostatikum pro kontrolu krvácení a má příznivé účinky na ledviny a pohlavní orgány.⁹

Atropin je toxický alkaloid, který byl údajně nalezen v lyciu z Indie. Metodou HPLC-MS bylo analyzováno 8 vzorků Lycia z Číny a Thajska. Atropin byl nalezen v koncentraci 19 ppb (w/w), což je pod hladinou toxicity.¹⁸ V lycium se nachází také zeaxanthin. Toto žluté karotenoidní barvivo se akumuluje v tukových tkáních, zejména v oblasti sítnice, kterou tak chrání před UV zářením.¹¹ Použití HPLC, bylo zjištěno, že lycium obsahuje 2952 mg karotenoidů na gram plodů, 98,6% je v podobě esterů a 77,5% karotenoidů přítomných v plodech lycia je právě zeaxanthin.¹⁹ V neposlední řadě se v rostlině lycium nachází také betain, který byl stanoven pomocí HPLC/MS ESI.²⁰ Betain je dusíkatá organická sloučenina, která je pojmenován podle cukrové řepy, latinsky *Beta vulgaris*, ve které se vyskytuje.¹¹ U zvířat se betain používá ke zvýšení rychlosti růstu a produkci vajec a jeho působení na lidský organismus má za následek zvýšení svalové hmoty a sportovních výkonů.^{11,21}

Lycium obsahuje i flavonoidy, zejména rutin a kyselinu chlorogenovou, které byly zjištěny za pomoci HPLC, dále pak quercetin a hesperidin.²²

Rostlina není považována za jedovanou. LD₅₀ byla stanovena na 8.3 g / kg.¹¹

2.3 Rod Vaccinium

Brusnice borůvka (*Vaccinium myrtillus*), známá všeobecně jako borůvka. Patří do čeledi *Ericaceae*, česky vřesovcovité. Roste v podobě keřů, má střídavé opadavé listy, které mají vejčitou, zašpičatělou a na okrajích jemně vroubkovaně pilovitou čepel. Plody jsou modročerné bobule s nakysle sladkou chutí.²³

Borůvky obsahují různé druhy flavonoidů, vitamínů dále i například chlorogenovou kyselinu. Zlepšují vidění pomocí regenerace rhodopsinu, dále slouží jako potencionální léčivo proti nemocem souvisejícím s věkem jako rakovina, cukrovka, hypertenze, neurodegradace, obezita, osteoporóza. Fungují jako prevence infekce močových cest u žen.²⁴ Výsledky studie antokyaninů s borůvkami ukazují, že antokyaniny mohou být absorbovány v jejich glykosidované a i acylované formě neporušeně až do krve člověka a že jsou zdroj potravy s vysokým obsahem antioxidantů.²⁵

2.4 Techniky úpravy rostlinného materiálu Solid-phase extraction (SPE)

Extrakce na pevné fázi je stále jednou z nejčastěji používaných technik na úpravu vzorku, neboť předchází problémům spojených s kapalnou extrakcí. Použitím SPE techniky dojde k úspoře času i chemikálií, je rychlá, snadno proveditelná a může být zautomatizována.

Nejčastější užití je pro přípravu kapalných vzorků, ale může být použita i s látkou pevnou, kdy dojde k extrakci do rozpouštědla. Existuje mnoho druhů adsorbentů a velikostí, za účelem, co nejkvalitnější extrakce.²⁶

2.4.1 Princip

Princip spočívá v tom, že dojde k účinné sorpci vzorku na pevný sorbent a tedy k zakoncentrování analytů, ostatní části vzorku by měly být drženy co nejméně. Poté dojde k uvolnění analytů ze sorbentu elucí vhodným rozpouštědlem, které má solvatační vlastnosti.²⁷

SPE kolonky se rozdělují podle užití vhodné pevné fáze na reverzní fázi, normální fázi, iontovou výměnu a adsorpční SPE.²⁶

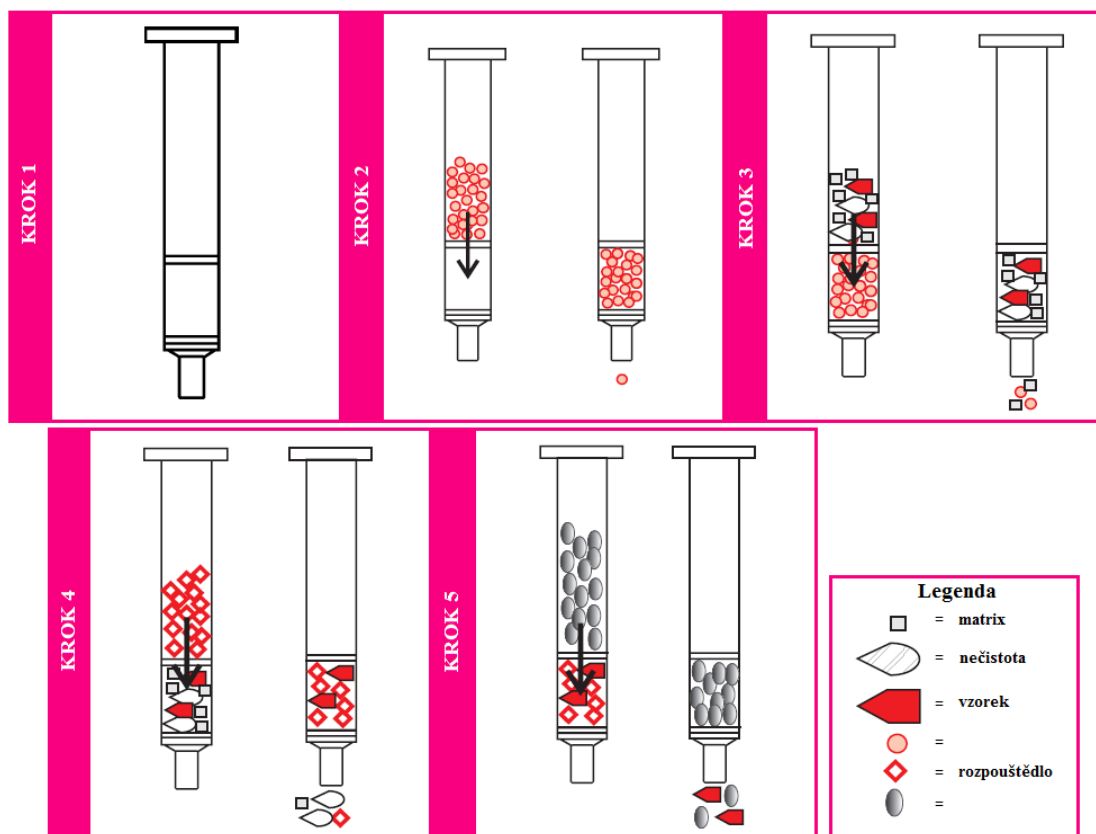
2.4.2 Využití²⁷

SPE jako technika se využívá k přečištění extraktů, kdy se odstraní nežádoucí komponenty z extraktu nebo z jiného vzorku vázaného na sorbentu. Cílem je minimální sorpce stanovených analytů, které jsou potřebné pro konečnou analýzu.

Výjimečně se může tato metoda použít pro transport analytů z místa odběru do místa zpracování, čímž dojde k eliminaci degradace či jiných nežádoucích procesů.

2.4.3 Postup²⁶

Postup se skládá z pěti základních kroků, popisující obr. 5.



Obr. 5 Postup při extrakci na pevné fázi

Krok 1 – správný výběr kolonky, krok 2 – aktivace kolonky rozpouštědlem, krok 3 – vložení vzorku, krok 4 – eluace nečistot, krok 5 – eluace analytu²⁶

2.5 Metody používané k analýze flavonoidů

2.5.1 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně chemická metoda určování hmotnosti atomů a molekul a jejich částí po jejich převedení na kladné a záporné ionty. Při vhodné interpretaci výsledků má metoda velmi dobrou vypovídající schopnost o struktuře analyzovaných látek.²⁸

V celosvětovém měřítku je známá pod zkratkou MS, což pochází z anglického výrazu mass spectrometry. Metoda hmotnostní spektrometrie je vhodná pro analýzu flavonoidů izolovaných z rostlin a potravin, neboť pokrok v této oblasti v posledních desetiletích ji zařadil mezi nejcitlivější. Poskytuje informace o přesné molekulové hmotnosti a struktuře. Dále pak strukturní informace o aglykonové a cukerné složce, glykosidové vazbě a jiné stereochemické informace.²

2.5.1.1 Princip

Zahrnuje tři hlavní části. Vznik daných iontů sledovaných atomů nebo molekul, dále je třeba ionty separovat podle poměru jejich hmotností k náboji a závěrem je změření zastoupení jednotlivých druhů separovaných iontů.²⁹

Ionizační techniky se mohou dělit na měkké a tvrdé. Při měkké ionizaci je energetický přebytek dodaný ionizované molekule malý a pravděpodobnost fragmentace molekuly je nízká. Tvrdá ionizační technika se užívá tehdy, kdy má dojít k rozsáhlé fragmentaci primárně vzniklého iontu a při této technice je dodaná energie vysoká.²⁸

K separaci iontů podle poměru jejich hmotnosti k náboji dochází v analyzátoch, které slouží k rozlišení iontů vzniklých v iontovém zdroji podle poměru jejich hmotnosti a náboje.²⁹

Na závěr se měří zastoupení jednotlivých druhů separovaných iontů. Toto měření se provozuje detektory, používaných ke stanovení jednotlivých druhů iontů. Výsledkem hmotnostní spektrometrie je hmotnostní spektrum, což je záznam znázorňující závislost rostoucí hodnoty m/z na odezvě detektoru, která je úměrná intenzitě iontového proudu.²⁹

2.5.1.2 Instrumentace²⁸

Hmotnostní spektrometr jako přístroj se skládá vždy z několika základních prvků (Schéma II). Iontový zdroj (1) jímž vznikají ionty. Dále je zde hmotnostní analyzátor (2) sloužící jako rozptylovací prvek, jenž umožňuje rozdělit směs iontů o různých poměrech m/z , které vznikají v iontovém zdroji. Detektor (3) je část hmotnostního spektrometru, na něž je směřován proud iontů po průchodu analyzátozem a také poskytuje signál přímo úměrný počtu dopadajících iontů. Tento signál je dále převeden do počítače (4) vybaveného vhodným programem, který zpracuje signál do formy hmotnostních spekter.

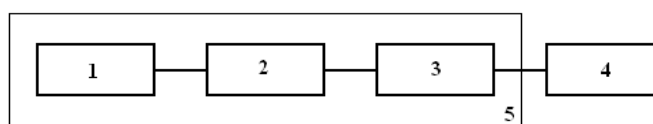


Schéma II *Blokové schéma hmotnostního spektrometru*

Toto zařízení pracuje za nízkých tlaků, kterých dosáhneme dvoustupňovým vakuovým čerpacím systémem (5).

2.5.1.2.1 Iontový zdroj²⁸

Tab. II *Tabulka iontových zdrojů*

název	ionizační technika	princip
ionizace elektronem (EI)	tvrdá	Patří mezi tvrdé ionizační techniky pro látky v plynné fázi. Procesem vedoucím k tvorbě iontů je interakce molekul látky a proudem urychlených elektronů.
chemická ionizace (CI)	měkká	Primárním zdrojem je také proud urychlených elektronů, jejich energie se ale nepřenáší na analyzovanou molekulu přímo, ale přes reakční médium. Reakční médium je nejčastěji plyn nebo páry nízkovroucí kapaliny a je umístěno v ionizační komůrce pod velkým tlakem – 50 až 150Pa. Nejčastěji se používá methan.

sprejové techniky	měkká	Patří mezi měkké ionizační techniky v kapalně fázi.
- termosprej		Nejstarší sprejová technika. Z chromatografické kolony je výstup v podobě kovové kapiláry, který je vyhříván na teplotu 200 až 300°C.
- elektrosprej		Dochází k rozprášení mobilní fáze přivedené do kovové kapiláry, vlivem nehomogenního elektrického pole mezi ústím kapiláry a protielektrody, která je uzemněna. Nad tuto kapiláru je přivedeno vysoké napětí.
- chemická ionizace za atmosférického tlaku		Vstupní kapilárou je přiváděna kapalná fáze z chromatografické kolony a tato kapilára ústí do pneumatického rozprašovače, jeho plášť je vyhříván na teplotu až 700°C.
MALDI		viz. strana 20, 2.5.2

Ionizační metody pro analýzu flavonoidů jsou ionizace elektronem a chemická ionizace v případě flavonoidů v plynném stavu, dále desorpční metody, kdy je užito MALDI a FAB a také sprejové techniky ESI a APCI.²

2.5.1.2.2 Hmotnostní analyzátor²⁸

Slouží k rozdělení iontů podle poměru jejich hmotnosti a náboje, m/z .

Tab. III *Tabulka nejpoužívanějších hmotnostních analyzátorů²⁸*

název	princip
Kvadrupólový analyzátor	Ionty vlétnou do prostoru mezi čtyři kovové tyče, čímž se dostanou do střídavého elektrického pole a začnou tak oscilovat. Pokud vhodně zvolíme hodnoty stejnosměrného a střídavého napětí a vhodný poměr iontů, projdou kvadrupólovým analyzátozem pouze ionty o určité m/z . Postoupnou změnou

v napětí v přístroji je možno nechat projít ionty o různě zvoleném intervalu hodnot m/s.

Hlavní výhodou je možnost rychlé změny hodnot napětí vkládaných na tyče, čímž je možné mnohonásobně zaznamenat hmotnostní spektra.

Iontová past (iont-trap)	Je trojrozměrnou obdobou kvadrupólu a umožňuje uzavřít ionty v ohraničeném prostoru za pomoci střídavého elektrického pole. Pracuje ve dvou fázích. Vstupní kruhovou elektrodou se přivede analyzovaná látka a proběhne ionizace elektrony, popř. proběhne ionizace v iontovém zdroji. Na středovou elektrodu se přivádí střídavé napětí o malé amplitudě, ionty se sdružují na stabilních uzavřených drahách a tím se akumulují v prostoru iontové pasti.
Průletový analyzátor (time of flight, TOF)	Princip rozdělení iontů je na základě odlišné doby letu z iontového zdroje do detektoru. Hmotnější iont se pohybuje pomaleji a do detektoru tak dorazí později. Je zřejmé že čas bude záviset na délce dráhy, kterou iont v trubici urazí. Konstrukčně je tvořen pouze evakuovanou trubicí. Potřeba velkých rozměrů je zde řešena reflektorem, což je elektrostatické zrcadlo znásobující dráhu iontů.

K analýze flavonoidů se používají zejména kvadrupólový analyzátor, iontová past a průletový analyzátor.²

2.5.1.2.3 Detektory²⁸

Detektory hmotnostní spektrometrie jsou dva typy. Detektor na přímá měření, kdy dochází k detekci elektrického proudu, který vzniká dopadem iontů. Druhý typ je násobičový detektor, který násobí elektrony vzniklé po dopadu iontů a poskytují signály pro jednotlivé ionty.

Tab. IV *Tabulka detektorů*²⁸

název	princip
elektronásobičové detektory	Po dopadnu iontu jsou z konverzní dynody vyraženy elektrony a jejich počet se dopadem na další dynody násobí. Dále jsou urychleny elektrickým polem ke kolektoru.
fotonásobičové detektory	Na tomto přístroji jsou ionty na pomocné kovové elektrodě předem konvertovány na elektrony, které po dopadu na scintilační stínítko dávají fotony. Tyto fotony vstupují do násobiče.

2.5.2 MALDI/MS

MALDI je zkratka z anglického The matrix assisted laser desorption/ionization, což je ionizační technika vyvinuta v roce 1987, čímž umožnila analyzovat vysokomolekulární látky, až do tří tisíc, pomocí hmotnostní spektrometrie.³⁰ Vznik iontů při MALDI musí splňovat dvě podmínky. Molekula absorbuje při vlnové délce laseru a energie fotonů laseru je rovná energii k vybuzení molekuly a tedy k ionizaci. Další splněnou podmínkou je přenos energie ve velmi krátkém čase.³¹

2.5.2.1 Matrice

Pokud se vzorek ionizuje laserem přímo, štěpí se nežádoucím způsobem a proto se používá matrice. Matrice je látka, díky níž se ionizační energie laseru přenáší na vzorek, tím brání nežádoucímu štěpení a napomáhá ionizaci samotného vzorku. Další výhodou matrice je, že umožňuje měřit molekulové hmotnosti více látek ve stejném vzorku.³¹

Matrice musí splňovat určité požadavky. Musí být rozpustná v rozpouštědlech kompaktními se vzorkem, být vakuově stabilní, absorbovat vlnové délky laseru, podporovat ionizaci vzorku. Nevýhodou je vznik nechtěného pozadí, kdy se musí dbát na možnost vzniku překryvu analyzovaných iontů s ionty matrice.³²

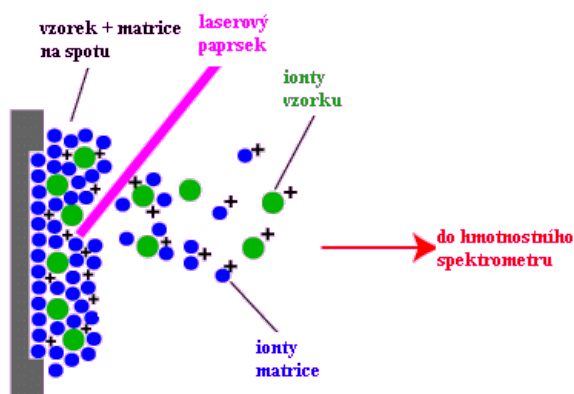
Kvalitu hmotnostního spektra ovlivňuje správná krystalizace vzorku s maticí a jak se projevuje při laserovém záření v přístroji. Při srovnání několika matic byly pro analýzu flavonoidů za nejvhodnější zvoleny THAP 2',4',6'-trihydroxyacetofenon a 2,5-

dihydroxybenzoová kyselina. Isoflavonoidy byly ionizovány v protonové formě s malým množstvím sodných a draselných iontů a při fragmentaci došlo pouze k ztrátě glykosidových zbytků. THAP byla vybrána za jednu z nejlepších, neboť pracuje s hrubým extraktem a ionizuje flavonolové glykosidy na pozitivní i negativní formy.²

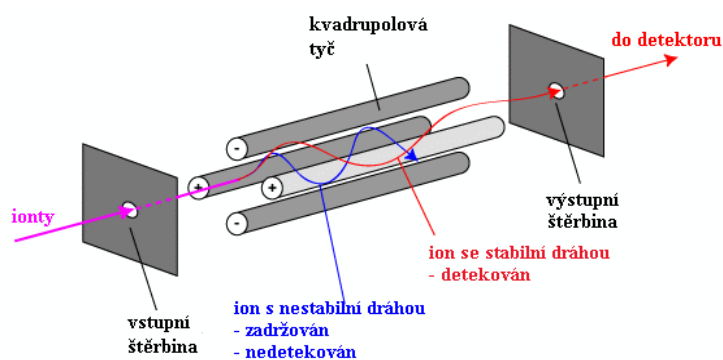
2.5.2.2 Průběh analýzy

MALDI je měkká ionizační technika. Směs vzorku a přebytku matrice se nanese na vhodný nosič. Matrice pohlcuje vlnové délky laseru, absorbuje energii a vytváří plazma, které vede k vypařování a ionizaci analytu (Obr. 5).²

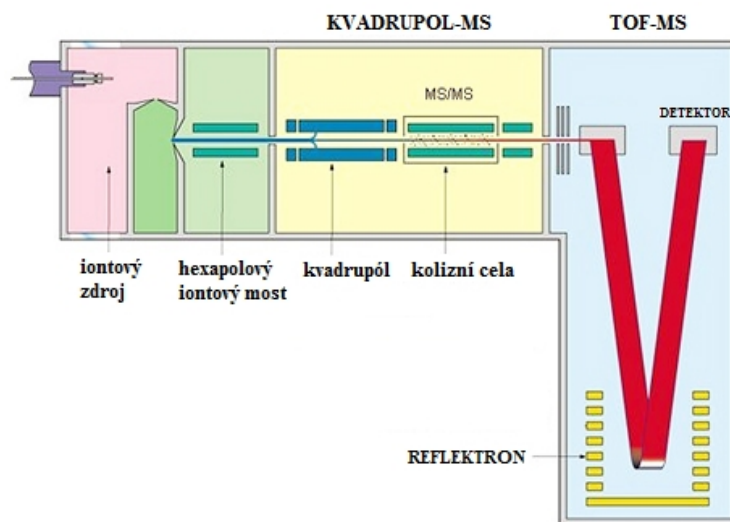
K separaci iontů podle m/z poté slouží kvadrupolový analyzátor. Ion se dostane do středu kvadrupólu, kde začne oscilovat. V okamžiku, kdy jsou oscilace stabilní pouze pro jeden ion s určitou hodnotou m/z , za určitého poměru stejnosměrného napětí a amplitudy U/V , tento ion prochází přes kvadrupól (Obr. 6) na detektor, všechny ostatní ionty zůstanou zachyceny v kvadrupólu. Skenováním hodnot U a V , kdy jejich poměr je konstantní se přes kvadrupól postupně dostávají všechny ionty.³³ Ty dále vstupují do vakua v trubici detektoru letu, kde se pohybují určitou rychlostí a který umožňuje měřit dobu průletu a z ní poté vypočítat rychlost.² Změří se doba letu částice a z ní se vypočte poměr molekulové hmotnosti a náboje částice (Obr. 7).³¹



Obr. 5 Štěpení vzorku s matricí pomocí laseru



Obr. 6 Kvadrupolový analyzátor



Obr. 7 Hmotnostní spektrometr Q-TOF

2.5.2.3 Využití

MALDI byla původně vyvinuta pro analýzu peptidů a bílkovin, dnes se používá pro analýzu nukleových kyselin nebo nízkomolekulárních organických i anorganických látek. Výhodou je vysoká citlivost a rychlost daného měření, vzorek se nerozpadá a mohou se tedy měřit složitější směsi. A v neposlední řadě také vysoká tolerance k nečistotám v analyzované látce, čímž je možné pracovat se surovými, nepřečištěnými extrakty a poskytovat citlivou detekci flavonoidních pigmentů v rostlinných tkáních.^{2,31}

Zajímavou možností této metody je potencionální využití přímé analýzy rostlinného materiálu bez předcházejících úprav. Tato analýza byla praktikována v roce 2002,

kdy analyzované houbové vzorky byly aplikovány na maldi destičku přímo jako nezpracované.³⁴

2.5.3 LC, LC/MS³⁵

Tato metoda se dnes často používá k analýze flavonoidů nejčastěji ve spojení s hmotnostní spektrometrií jako způsobu detekce.

Dochází zde k spojení dvou odlišných systémů. Kapalinová chromatografie analyzuje obecně látky netěkavé, polární nebo vysokomolekulární. Přechodový člen mezi přístroji musí spojit přístroj, jenž pracuje za vysokého tlaku a přístroj, který pracuje ve vysokém vakuu.

Spojení těchto přístrojů může být off-line nebo on-line. Při off-line se frakce eluátu sbírá, mobilní fáze se vypaří na injektor spektrometru a vzorky se zavádějí do iontového zdroje. Spojení je levnější, ale pracnější. On-line spojení vede k použití přechodu (přechodového členu, interface), který způsobuje zrychlení analýzy, zmenšení ztrát vzorku, možnost vyhodnocení i neúplně rozlišených píků a jednoduchost postupu.

Lze použít několik typů přechodů. Buď se eluát přímo zavádí do iontového zdroje spektrofotometru nebo je tam přechodový člen, jenž expanduje paprsek kapaliny nebo má dopravní pásek.

2.5.3.1 Využití

Tato metoda našla své široké uplatnění v potravinářském průmyslu na charakterizaci a kvantifikaci složek, jenž podmiňují chuť, nutriční vlastnosti a možnou toxicitu potravin. Své zastoupení má také v průmyslu farmaceutickém, kde jde o léky a jejich syntetické meziproducty a nečistoty. Toxikologie využívá LC-MS pro charakterizaci a kvantifikaci návykových látek a jejich metabolitů a ekologie pro analýzu polutantů vody a půd.²⁸ LC-MS se často používá k určení výskytu dříve identifikovaných sloučenin nebo se zaměřuje na izolaci nových látek.²

Při srovnání LC a MALDI-TOF-MS bylo zjištěno, že obě techniky dávají srovnatelné kvantitativní profily antokyaninů, LC může rozlišit i izomery antokyaninů a MALDI-TOF-MS umožňuje velmi rychlé provedení analýz.²

Ve studii z roku 2000 byly porovnány techniky LC s UV detekcí a MALDI-TOF-MS v určení množství antokyanů. Analýzy byly provedeny na borůvkách. Obecně platí, že

obě techniky poskytly srovnatelné anthokyaninové profily. Metodou LC se podařilo dosáhnout rozdělení a identifikace anthokyaninových izomerů. MALDI-TOF-MS analýza je vhodná jako rychlá alternativa pro analýzu antokyaninů v plodech.³⁶

Metodou LC se stanovil obsah antokyaninů v průběhu zrání hroznů *Vitis vinifera* L., celkový obsah antokyanů se zvýšil 4x od počátků do konce zrání a během doby zrání a průběžných odběrů byl nejhojnější malvidin-3-glukosid.³⁷ Metoda byla použita i na separaci a koncentraci antokyaninů a dalších sloučenin v *Amelanchier alnifolia*, metodou bylo stanoveno, že vzorek obsahuje zejména cyanidin 3-galaktosid a cyanidin 3-glukosid a také cyanindin 3-xylosid, chlorogenovou kyselinu a rutin.³⁸

Delfinidin, cyanidin, petunidin, pelargonidin, peonidin a malvidin byly nalezeny v borůvce (*Vaccinium myrtillus*), černém rybízu (*Ribes nigrum*), jahodě (*Fragaria ananassa* cv. *Jonsok*) a Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera*).³⁹

Tato metoda se stala nejvíc používanou, neboť je efektivní a snadná pro on-line analýzu flavonoidů. Jen zřídka se používá pro úplnou charakteristiku struktury molekuly, ale poskytuje molekulární hmotnost jednotlivých složek.¹

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie

Absolutní metanol pro HPLC analýzu od firmy BIOSOLVE B.V. (Valkenswaard, Nizozemí), dále byla použita 35% kyselina chlorovodíková p.a. od firmy LACH-NER, s.r.o. (Neratovice, ČR), aceton od firmy SIGMA-ALDRICH (St. Louis, USA), a THAP (2,4,6-trihydroxyacetophenone) od stejné firmy (Switzerland) a acetonitril od firmy MALLINCKRODT BAKER b.v. (Deventer, Nizozemí)

Plody lycia byly zakoupeny v zahradnictví Kruh Jilemnice a poté pěstovány ve skleníku po dobu půl roku. Plodily v srpnu 2010, byly sesbírány a zamraženy po dobu jednoho měsíce. Plody vaccinium byly zakoupeny v potravinách jako již zpracované a zmrzlé od výrobce NOWACO Opava s.r.o.

3.2 Příprava extrakčního činidla

Pro přečištění rostlinného materiálu byla použita SPE extrakce. Pro extrakci flavonoidů z plodů byly připraveny dvě extrakční činidla:

Extrakční činidlo 1.

První extrakční činidlo bylo připraveno jako směs metanolu a 0,01% (v/v) kyseliny chlorovodíkové na 100 ml roztoku.

Extrakční činidlo 2.

Do druhého extrakčního činidla byla jako další chemikálie přidána aceton, kde vznikla směs 100 ml acetonu a metanolu (1:1) okyselená 0,01% (v/v) kyselinou chlorovodíkovou.

3.3 Příprava vzorku *Lycium chinense* a *Vaccinium myrtillus*

Pro analýzu vzorku byly plody rostlin rozděleny na dvě části, na dužinu a slupku pomocí skalpelu. Dužina se semeny byla rozdrcena pomocí třecího tloučku a misky na co nejmenší částice.

Dužina jednoho plodu byla navážena do množství 1g a extrahována v 10ml extrakčního činidla 1 a 2. Taktéž se postupovalo s dužinou druhého plodu a se slupkami obou plodů. Výsledkem bylo 8 vzorků, které byly extrahovány 48 hodin.

Přečištění rostlinného materiálu bylo provedeno na kolonkách Strata-SPE (polymerní sorbent Strata SDB-L, 100 μm , 200mg/3ml, Phenomenex, USA). SPE kolonka byla aktivována 2 ml 0,01 % (v/v) kyseliny chlorovodíkové v metanolu a po promytí 2 ml 0,01% kyseliny chlorovodíkové v deionizované vodě na ni byly nanесeny 2 ml vzorku. Vysoce polární látky (sacharidy, ovocné kyseliny atd.) byly odstraněny promytím 4 ml 0,01 % (v/v) kyselinou chlorovodíkovou ve vodě a zachycené antokyaniny byly eluovány 2 ml 0,01 % kyselinou chlorovodíkovou v metanolu.

Jednotlivé frakce každého vzorku byly odpařeny do sucha nebo na poloviční původní objem pod proudem dusíku pomocí TurboVapu.

3.4 Příprava matrice pro MALDI-MS-TOF

Na přípravu matrice o koncentraci 0,134 mol/l bylo použito 25 mg THAP a 1 ml směsi acetonitrilu a vody (1:1).

3.5 Příprava spotů na destičce pro MALDI-MS-TOF

Nanesení vzorků na destičku bylo provedeno smícháním 5 μl matrice a 5 μl extrahovaného vzorku. Výsledná směs se nanášela jako 1 μl na 1 spot na destičce.

Po krystalizaci matrice se vzorkem se destička vložila do hmotnostního spektrometru Maldi Q-TOF Premier (Waters).

3.6 Přístroje a vybavení

Hmotnostní spektrometr

Byl použit Hybridní hmotnostní spektrometr Q-TOF Premier (Waters) Corporation (Milford, USA) s ionizací typu MALDI. Experimentální podmínky byly následující: Vlnová délka laseru byla 337,1 nm, pulsní energie 280 μJ (10 Hz), kolizní energie 5 V, průtok chladicího plynu 10 ml/h, průtok kolizního plynu 0,32 ml/h.

Další laboratorní přístroje

Pro navážky vzorků lycia, vaccinia a chemikálií byly použity váhy Mettler Toledo (Švýcarsko) s přesností na 0,0001g. Pro koncentraci extrahovaných i přečištěných roztoků byl použit přístroj TurboVap (Caliper, USA).

3.7 Postupy vyhodnocení

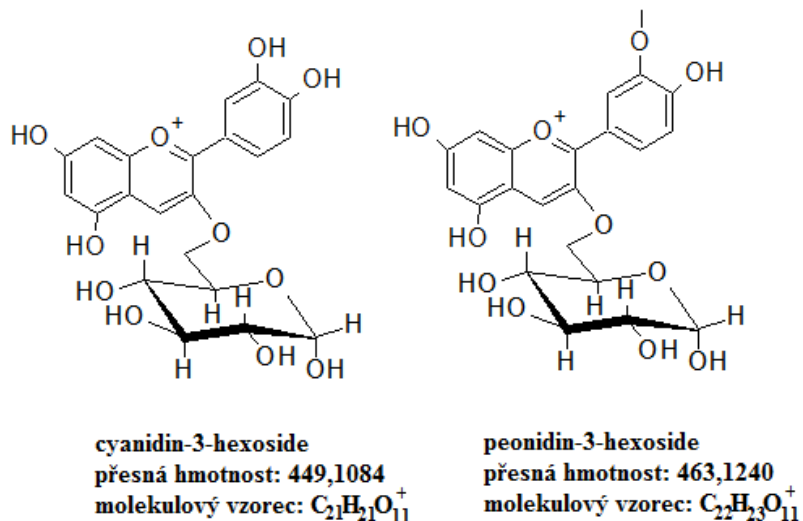
Pro vyhodnocení výsledků analýzy z hmotnostního spektrometru bylo použito programu MassLynx 4.0 Global Mass Informatics Waters, zpřístupněný Univerzitou Palackého v Olomouci a ADC/ChemSketch Freeware.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Analýza antokyaninů pomocí MS

Plody rostlin *Lycium chinense* a *Vaccinium myrtillus* byly analyzovány metodou hmotnostní spektrometrie MALDI-MS. Oba plody byly extrahovány ve dvou extrakčních činidlech, první použité extrakční činidlo bylo směs metanolu a 0,01% (v/v) kyseliny chlorovodíkové, druhé metanol a aceton (1:1) s 0,01% (v/v) kyselinou chlorovodíkovou. Plody samotné byly analyzovány zvlášť jako slupka a dužina a použitý rostlinný materiál byl analyzován jako extrahovaný i jako následně přečištěný pomocí SPE techniky.

Výsledky byly potvrzeny pomocí výpočtu přesné hmoty a tandemové hmotnostní spektrometrie (MSMS). V této metodě jsou ionty vystaveny dvěma nebo více po sobě následujícími stadii analýzy, tyto stádia mohou být odděleny prostorově nebo časově, podle poměru m/z.⁴⁰ Struktura antokyaninu byla zakreslena v programu ChemSketch, kde zde získaný vzorec byl aplikován do Molecular mass calculator v programu MassLynx, který vypočetl přesnou hmotnost (Obr. 8)



Obr. 8 Struktura cyanidin-3-hexosidu a peonidin-3-hexosidu z programu ChemSketch

Na základě této přesné hmoty byly získány ze spektra intenzity výskytu jednotlivých antokyaninů a jejich relativní chyby, které jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka V. Spektrum antokyaninů ve vzorku

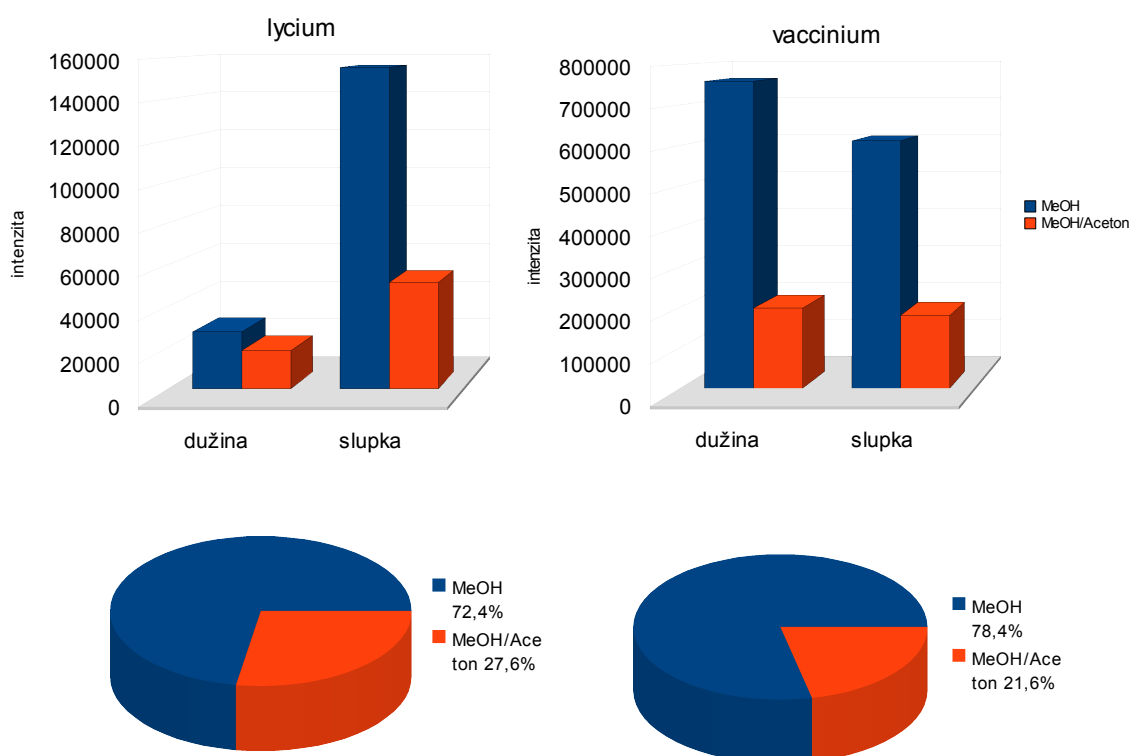
MS	MS ²	naměřená hodnota	vypočtená hodnota	relativní chyba (ppm)	název antokyaninů
LYCIUM					
271		271,0626	271,0606	7,4	pelargonidin
287		287,0550	287,0556	2,1	cyanidin
301		301,0659	301,0712	17,6	peonidin
303		303,0528	303,0505	7,6	delphinidin
317		317,0757	317,0661	> 20	petunidin?
331		331,0835	331,0818	5,1	malvidin
419	287	419,0989	419,0978	2,6	cyanidin-3-pentosid
449	287	449,1086	449,1084	0,4	cyanidin-3-hexosid
463	301	463,1225	463,1240	3,2	peonidin-3-hexosid
479	317	479,1141	479,1190	10,2	petunidin-3-hexosid
487	325	487,1249	487,1240	1,8	5-methylpyranocyanidin-3-hexosid
493	331	493,1344	493,1346	0,4	malvidin-3-hexosid
501	339	501,1372	501,1397	5,0	5-methylpyranopeonidin-3-hexosid
517	355	517,1361	517,1346	3,1	5-methylpyranopetunidin-3-hexosid
531	369	531,1519	531,1503	3,0	5-methylpyranomalvidin-3-hexosid
595	287	595,1447	595,1452	0,8	cyanidin-3-kumarylhexosid?
595	287	595,1698	595,1663	5,9	cyanidin-3-rutinosid?
625	301	625,1754	625,1769	2,4	peonidin-3,5-dihexosid
VACCINIUM					
271		271,0869		> 20	pelargonidin?
287		287,0863		> 20	cyanidin?
301		301,1021		> 20	peonidin?
303		303,0810		> 20	delphinidin?
317		317,0955		> 20	petunidin?
331		331,1039		> 20	malvidin?
419	287	419,1040	419,0978	14,8	cyanidin-3-pentosid
435	303	435,1094	435,0927	> 20	delphinidin-3-pentosid?
449	287	449,1086	449,1084	0,4	cyanidin-3-hexosid
463	301	463,1225	463,1240	3,2	peonidin-3-hexosid
479	317	479,1141	479,1190	10,2	petunidin-3-hexosid
487	325	487,1261	487,1240	4,3	5-methylpyranocyanidin-3-hexosid
493	331	493,1344	493,1346	0,4	malvidin-3-hexosid
501	339	501,1372	501,1397	5,0	5-methylpyranopeonidin-3-hexosid
517	355	517,1364	517,1346	2,9	5-methylpyranopetunidin-3-hexosid
531	369	531,1519	531,1503	3,0	5-methylpyranomalvidin-3-hexosid
595	287	595,1345	595,1452	18,0	cyanidin-3-kumarylhexosid?
595	287	595,1609	595,1663	9,1	cyanidin-3-rutinosid?
609	301	609,1585	609,1608	3,8	peonidin-3-kumarylhexosid?
609	301	609,1859	609,1819	6,6	peonidin-3-rutinosid?
625	301	625,1845	625,1769	12,2	peonidin-3,5-dihexosid
639	331	639,1642	639,1714	11,3	malvidin-3-kumarylhexosid?
639	331	639,2016	639,1925	14,2	malvidin-3-rutinosid?

Jak je patrné z tabulky, nachází se zde detekován rutinoid a kumarylhexosid u několika antokyaninů. Identifikace těchto látek byla potvrzena pomocí výpočtu přesné hmoty, avšak pro přesnější identifikaci by bylo potřeba separace těchto látek pomocí kapalinové chromatografie, neboť obě látky se vykazují shodnou fragmentační cestou.

U některých látek (označeny otazníkem) se relativní chyba pohybovala nad 20 ppm, tyto látky většinou odpovídaly aglykonům. Potvrzení jejich identifikace by bylo také vhodné provést další experimenty např. LC s UV detekcí. Metodou MALDI-MS se nám tedy podařilo provést první rychlý screening a dalšími experimenty se budeme zabývat v navazující práci.

4.1.1 Extrakční činidlo

Výběr extrakčního činidla je důležitý, pro co nejlepší výsledek dané analýzy. Extrakční činidlo, jenž výsledky analýzy prokázaly za nejvhodnější, je směs metanolu a 0,01% (v/v) kyseliny chlorovodíkové, při jejímž použití jsme pozorovali nejvyšší intenzity antokyaninů. U obou námi zvolených plodů vyšla tato analýza totožně. Výsledky potvrzuje graf I.



Graf I. Srovnání extrakčního činidla 1 a 2 u obou plodů

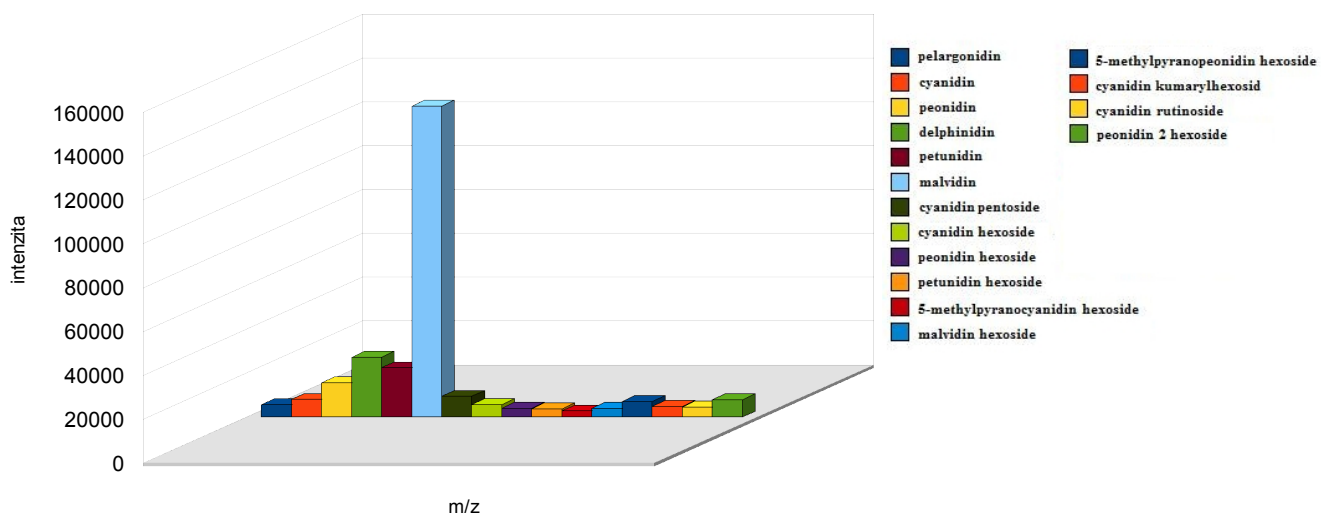
Na základě grafu I. můžeme semikvantitativně pozorovat, že nejvyšší intenzita antokyaninů v lyciu je ve slupce bez ohledu na použité extrační činidlo a naopak u vaccinia je největší množství antokyaninů právě v dužině. Rozdílné výsledky můžeme vysvětlit např. tím, že v plodech probíhá nerovnoměrné rozdělování organických látek, které vznikly fotosyntézou, mezi něž patří i antokyaniny. Dále pak tím, že plody lycia dozrávaly ve skleníku v období silných dešťů a následných vysokých teplot a průběh zrání může mít také následky a ukládání anthokyaninů v plodech.

4.1.2 Antokyaniny v analyzovaných plodech

Použitím okyseleného metanolu jako extrakčního činidla, bylo u našich plodů získáno široké spektrum antokyaninů, jejichž výčet můžeme pozorovat v tabulce V. V obou plodech byly identifikovány jednotlivé aglykony antokyaninových barviv, antokyaniny obsahující cukerné jednotky i složitější antokyaninové barviva. Identifikace byla potvrzena pomocí přesné hmoty a fragmentace jednotlivých antokyaninů.

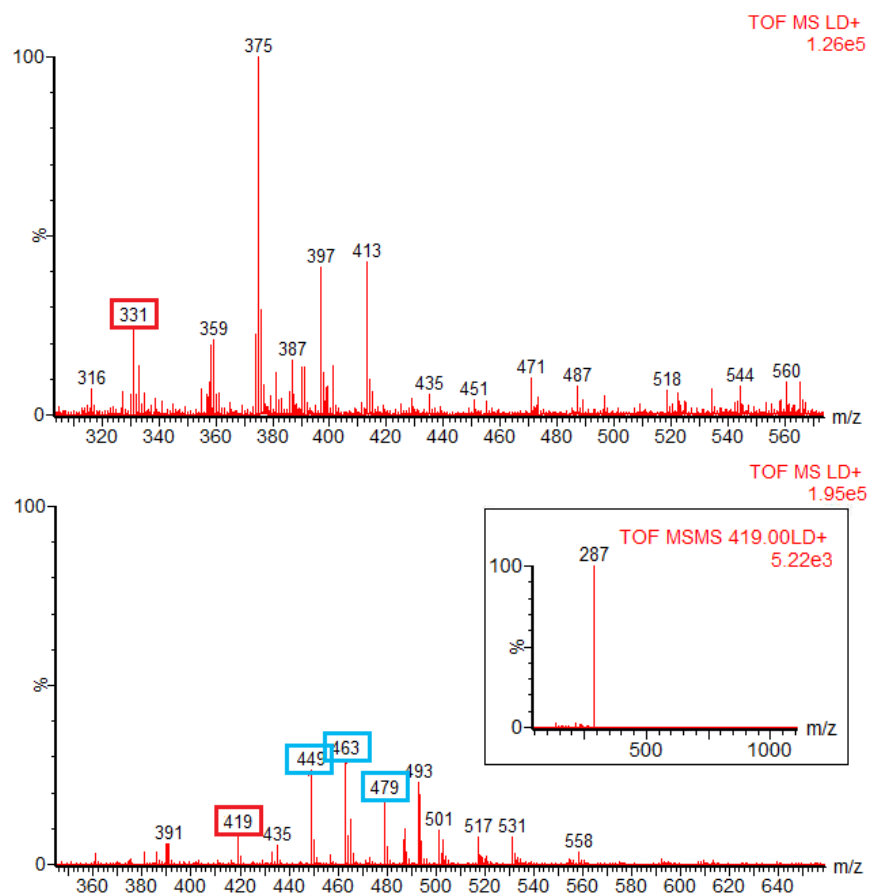
4.1.2.1 Lycium

Analýza tohoto plodu byla dle pročtených studií prováděna jako jedna z prvních. Veškeré antokyaniny objeveny touto analýzou byly hledány v závislosti na nalezených antokyaninech ve vacciniu a dále potvrzeny nebo vyloučeny fragmentační hmotnostní spektrometrií. Až do konce roku 2010 neuvádí literatura jedinou analýzu zabývající se antokyaniny v rostlině rodu *Lycium*. Hledanými látkami v této rostlině byly pouze některé flavonoidy jako rutin, jenž byl nalezen, pomocí HPLC a LC-APCI MS, v listech *Lycium barbarum* ve vysokém množství (16.03–16.33 mg/g). V plodu rostliny analýza detekovala množství mnohem menší.⁴¹ V lyciu byla nalezena kyselina chlorogenová pomocí metody HPLC a dále i quercetin a hesperidin.²² V roce 2010 bylo analyzováno *Lycium ruthenicum Murr* pomocí HPLC-DAD a HPLC-ESI-MS. Analýza prokázala přítomnost 14 antokyaninů, z nichž 10 bylo identifikováno i kvantifikováno. Výsledky vykazovaly nejvyšší přítomnost petunidinu a jeho derivátů z celkového množství všech antokyaninů až 95%.⁴²



Graf II. Intenzita antokyaninů v lycium

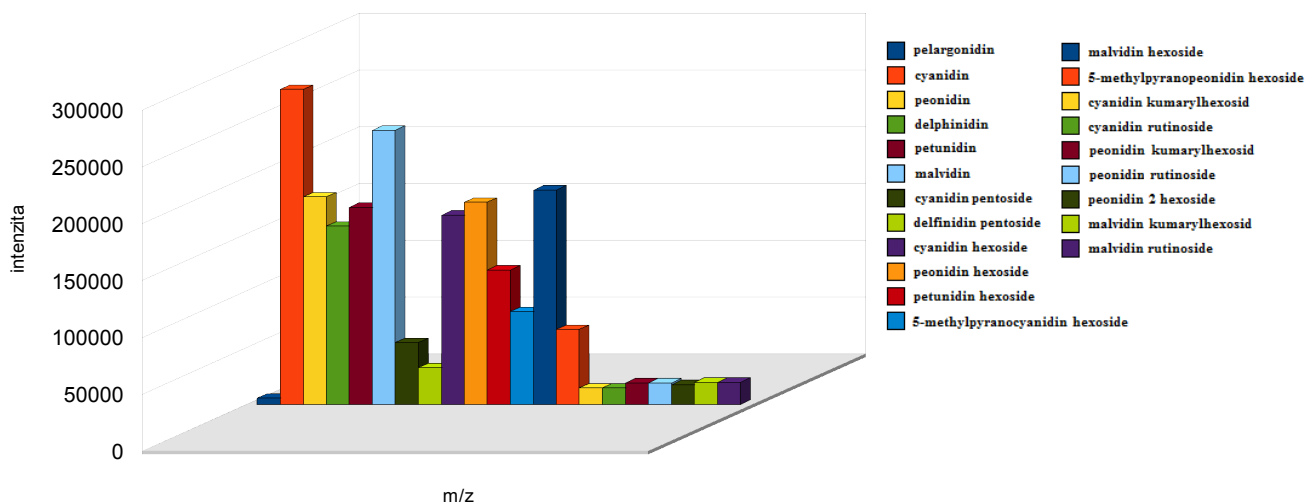
V metanolickém roztoku lycia se podařilo pomocí MALDI-MS hrubě detekovat 15 antokyaninů, z čehož 53% tvoří malvidin (m/z 331) a jeho deriváty. Nejhojnější glykosylovaný antokyanin je cyanidin pentosid (m/z 419), jak ukazuje graf II. Rozlišný antokyaninový profil *Lycium chinense* a *Lycium ruthenicum* se pravděpodobně dá přisuzovat diferencí druhu tohoto rodu, kde *Lycium chinense* má oranžovočervené zbarvení a *L. ruthenicum* je tmavě modré až černé. Dalším parametrem je odlišná volba extrakčního rozpouštědla.⁴¹ Graf II. ukazuje MS spektrum metanolického extraktu lycia s hlavními zastoupenými antokyaniny a MSMS spektrum cyanidinu pentosidu.



Obr. 10 Spektrum antokyaninů - malvidin (m/z 331) a cyanidin pentosid (m/z 419) a jeho fragmentace

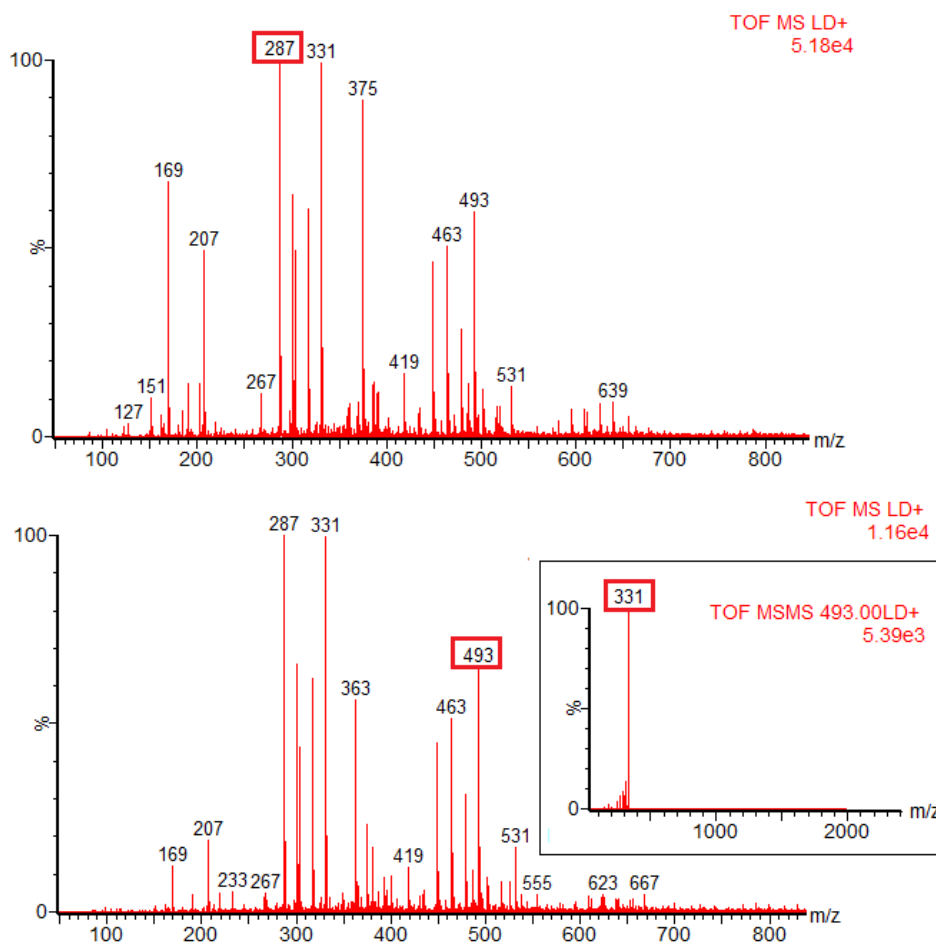
4.1.2.2 Vaccinium

Vaccinium je rostlina, v níž byla přítomnost antokyaninů potvrzena již dávno a několikrát. Pomocí LC-MS a UV spektroskopie byl zjištěn antokyaninový profil, kde mezi hlavní zde se vyskytující antokyaniny byly delphinidin, petunidin a malvidin a jejich cukerné deriváty (arabinsid, galaktosid a glukosid).⁴³ Metodou HPLC-MS bylo detekováno 5 hlavních antokyaninů cyanidin, delphinidin, peonidin, malvidin a petunidin, a jejich cukerné deriváty.^{8,43,44}



Graf III. *Intenzita antokyaninů ve vacciniu*

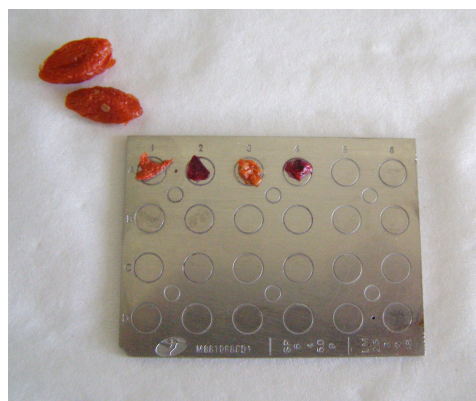
V metanolické roztoku lycia se podařilo pomocí MALDI-MS analýzy semikvantitativně prokázat přítomnost 18 antokyaninů. Nejhojněji zastoupený antokyaninový aglykon byl cyanidin (m/z 287), který se v plodech vaccinia vyskytuje z 26% spolu s jeho deriváty. Nejvíce zastoupený glykosylovaný antokyanin je malvidin hexosid (m/z 493). Studie několikrát potvrdily, že malvidin byl analýzou HPLC-MS detekován jako antokyanidin z nejvyšším procentem výskytu u vaccinia.^{44,45} Tento antokyanin byl v naší analýze hrubě detekován jako druhý nejvíce se vyskytující, malvidin a jeho deriváty se ve vacciniu nacházejí z 22%. Obr. 11 ukazuje MS spektrum metanolického extraktu vaccinia s hlavními zastoupenými antokyaniny a MSMS spektrum malvidin hexosidu.



Obr. 11 Spektrum antokyaninů - cyanidin (m/z 287) a malvidin hexosid (m/z 493) a jeho fragmentace

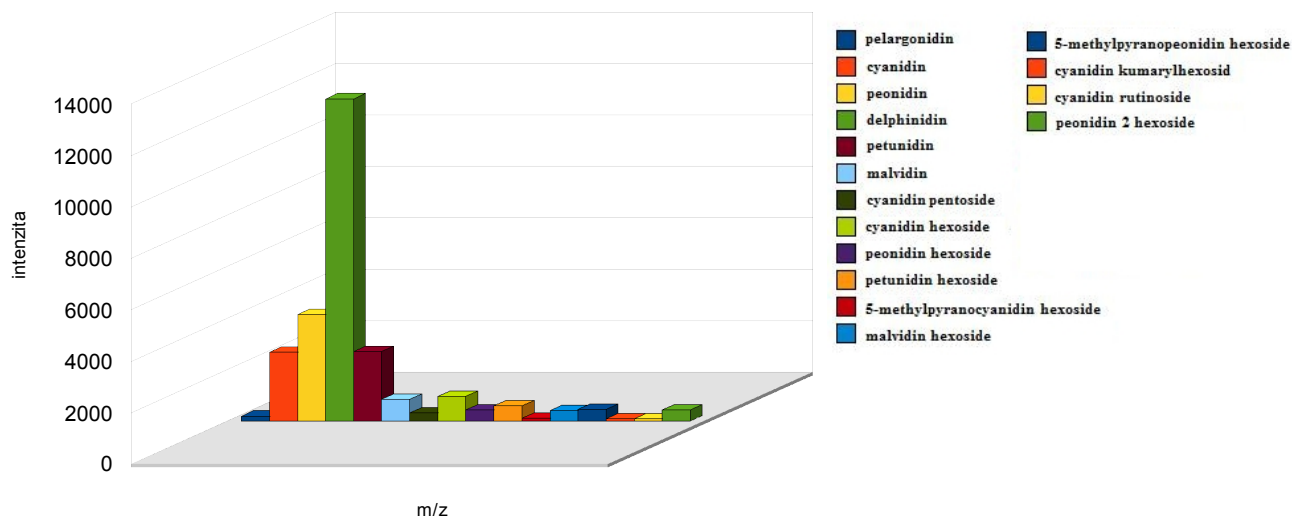
4.2 Antokyaniny v analyzovaných pevných částech plodů

V příkládané práci byla vyzkoušena přímá analýza plodu pomocí MALDI-MS. Tato technika v sobě skýtá výhody velmi rychlého screeningu plodu, který není nijak předem upraven. Jednotlivý plod je pouze nakrájen chirurgickým skalpelem na velmi malé částičky (v našem případě i separován pomocí skalpelu na dužinu a slupku). Na spot maldi destičky, která se zavádí do přístroje, je nanesen nařezaný kus plodu a překryt matricí (Obr. 12). Samotná analýza i s přípravou vzorku tedy celkově trvá pouze několik minut.



Obr. 12 Destička s kusy plodu a maticí

Výsledky získané pomocí této nové a velmi rychlé techniky prokázaly přítomnost stejného spektra antokyaninů jako při screeningu předupraveného plodu pomocí extrakce. Celková intenzita spektra byla pouze 7 krát nižší. Antokyaninový profil byl dokonce shodný i s analýzou extraktu plodu po SPE přečištění. Tato technika by v budoucnu mohla sloužit k rychlému screeningu nejen rostlinných materiálů.

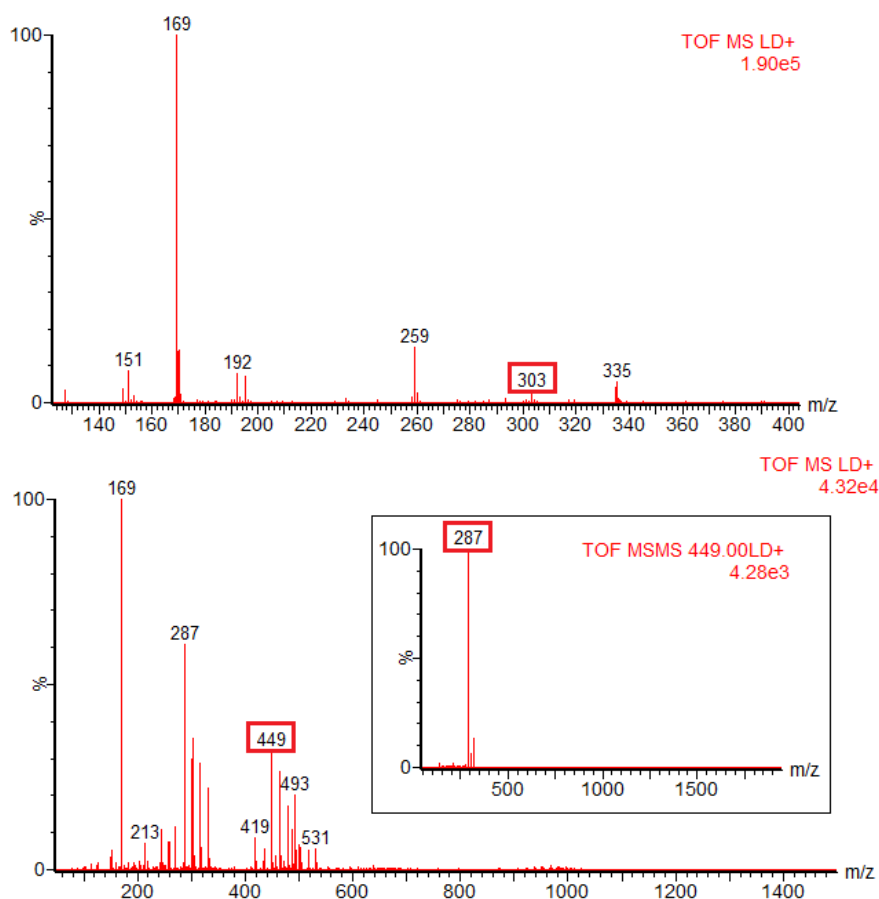


Graf IV. Intenzita antokyaninů pevném plodu lycia

Analýza tohoto typu u lycia prokázala největší hojnost delphinidinu (m/z 303) a z glykosidovaných antokyaninů byl nejvíce zastoupený cyandin hexosid (m/z 449). Tyto dva

antokyaniny tvoří 50% celého spektra antokyaninů u tohoto plodu. (Graf IV.) Obr. 12 ukazuje MS spektrum plodu lycia s hlavními zastoupenými anthokyaniny a MSMS spektrum cyanidin hexosidu.

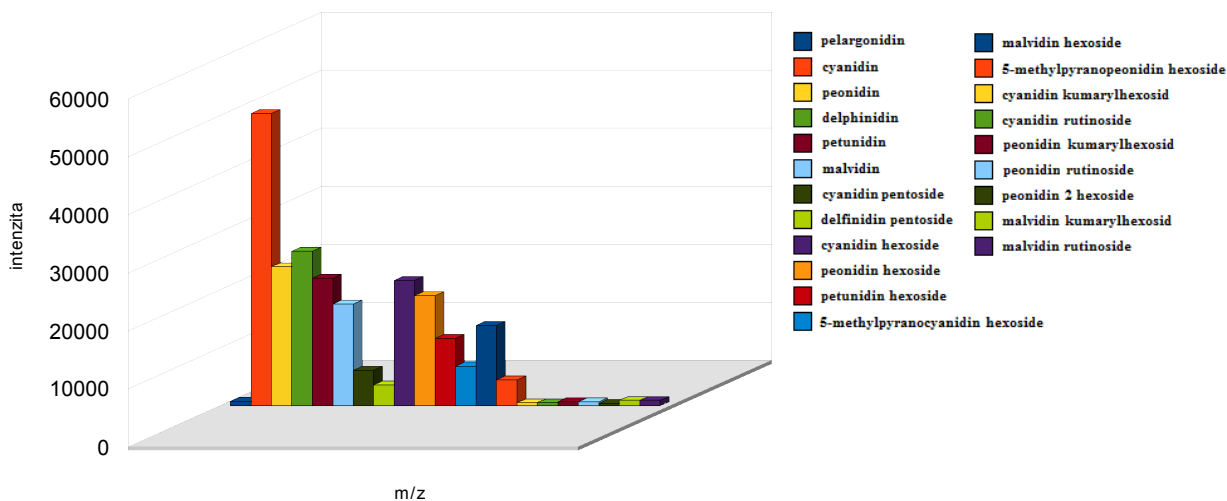
Hlavní antokyanin analýzy pomocí rychlého screeningu se liší od antokyaninů extrahovaného. Důvodů, proč se tomu tak stalo, může být několik. Extrakce použitým rozpouštědlem může diskriminovat jiné látky, které jsme poté ve spektru nedetekovali. Při analýze, kdy je použito extrakční rozpouštědlo, se nemusely zcela extrahovat všechny antokyaniny do činidla, které se poté nanáší na maldi destičku s matricí. Dalším důvodem může být problém přichycení plodu na Maldi destičku, při skenování laserem se skenuje pouze povrch plodu, nikoli plod celý. Výsledkem tohoto je, že rozložení anthokyaninového profilu může být právě pro tyto důvody odlišné od extrahovaného roztoku.



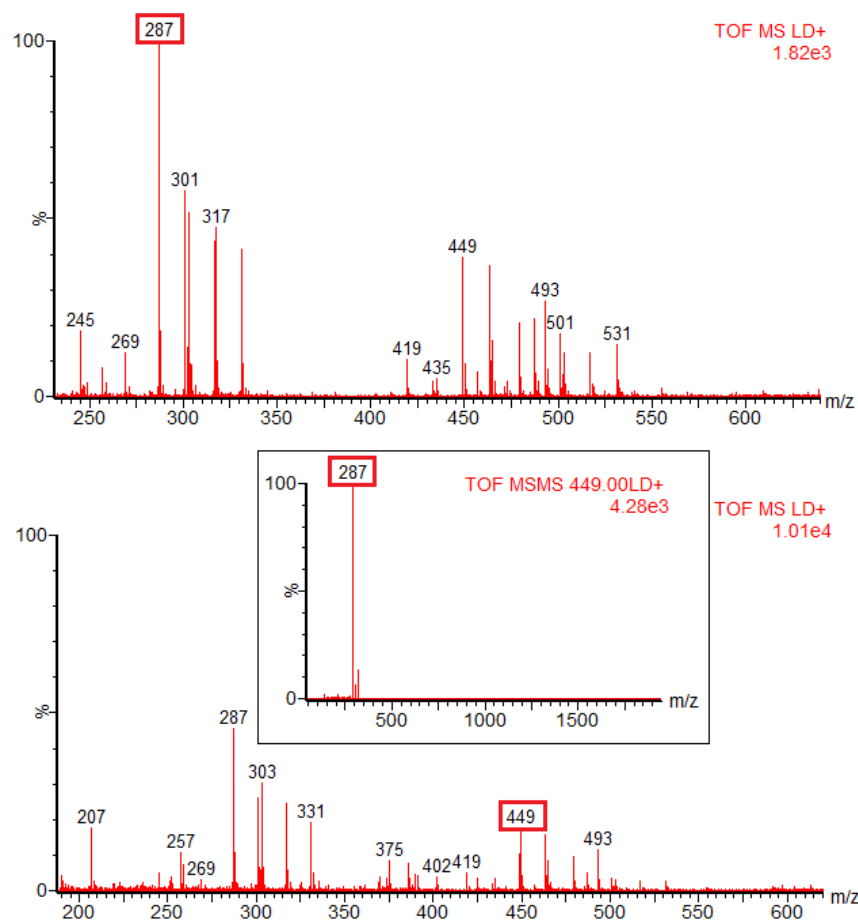
Obr. 12 Spektrum antokyaninů - delphidin (m/z 303) a cyanidin hexoside (m/z 449) a jeho fragmentace

Analýza u vaccinia za použití rychlého screenigu prokázala přítomnost spektra antokyaninů, které je vyobrazeno v grafu V. Aglykon, který se zde vyskytuje nejhojněji je souhlasný s nejhojnějším aglykonem v analýze za použití extrakčního činidla a přečistění pomocí SPE techniky. Jedná se tedy o cyanidin (m/z 287) a nejvíce se vyskytující glykosilovaný antokyanin jeho derivát cyanidin hexosid (m/z 449), jenž společně tvoří 31% z celkového spektra antokyaninů. Obr. 15 ukazuje MS spektrum plodu (dužina) vaccinia s hlavními zastoupenými anthokyaniny a MSMS spektrum cyanidin hexosidu.

Malvidin a jeho deriváty, jenž se dle studií vyskytují ve vacciniu nejhojněji, v této analýze tvoří 13,5%.



Graf V. *Intenzita antokyaninů pevném plodu vaccinia*

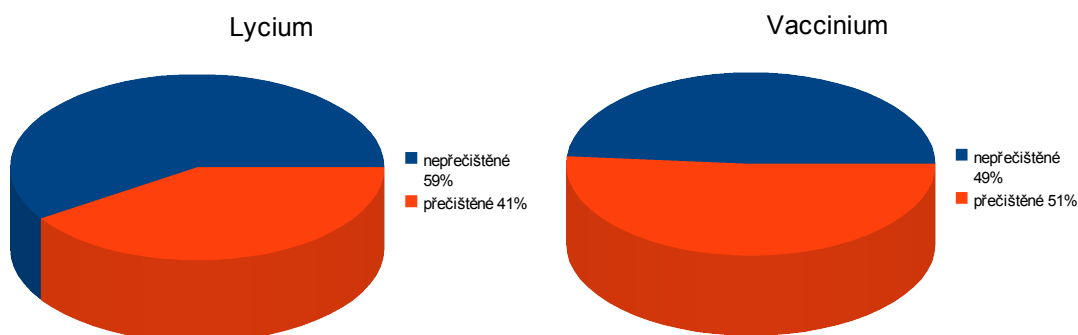


Obr. 13 Spektrum antokyaninů - cyanidin (m/z 287) a cyanidin hexoside (m/z 499) a jeho fragmentace

4.3 Použití SPE techniky

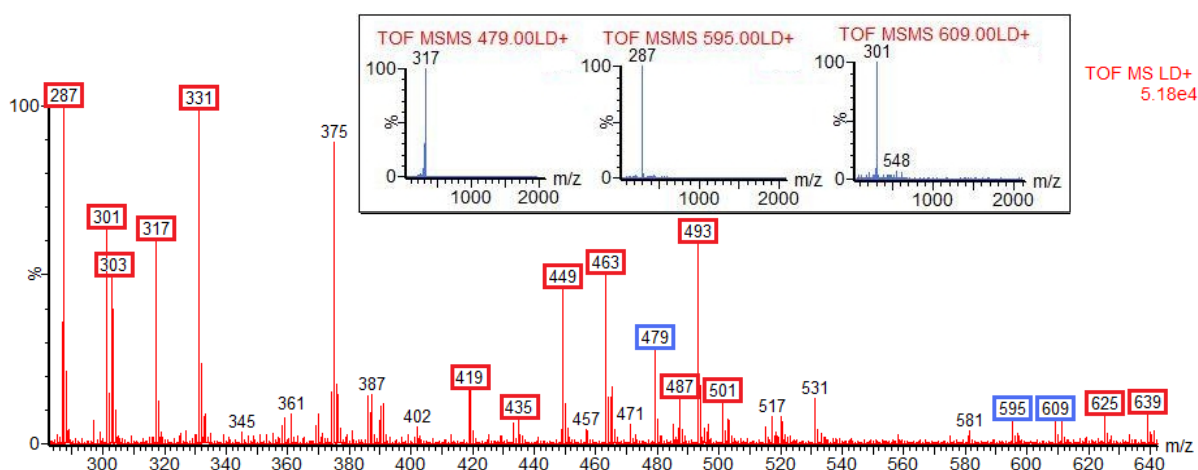
Při této analýze byly vzorky extrahovány a dále přečištěny pomocí Strata SPE kolonek. Postup se skládá z pěti základních kroků. Důležitý je výběr správné kolonky pro budoucí analýzu. Dalším krokem byla kondicionace kolonky vhodným rozpouštědlem – methanolem s 0,01 % (v/v) kyselinou chlorovodíkovou, kdy dojde k aktivaci skupin vázaných na sorbentu, poté dojde k přesnému vložení vzorku do kolonky pomocí pipety, kdy vzorek by měl být ve formě, která je kompatibilní se SPE. Následuje odstranění nečistot a látek nechtěných v dále analyzovaném vzorku pomocí 0,01 % (v/v) kyseliny chlorovodíkové ve

vodě a v závěru postupu dochází k eluaci přečištěného analytu opět pomocí okyseleného metanolu.²⁶



Graf VI. Srovnání intenzity antokyaninů při použití SPE techniky

Na grafu VI. můžeme pozorovat, že použití SPE techniky k přečištění rostlinného materiálu je možné, ale není nezbytné, neboť i bez něj byla intenzita antokyaninů vysoká, výsledné spektrum bylo široké a nijak se od nepřečištěného spektra výrazně nelišilo. Na obr. 14 můžeme pozorovat spektrum je čisté a rozsáhlé, bylo potvrzeno přečištěného extraktu vaccinia a některé fragmentační pochody jednotlivých anthokyaninů.

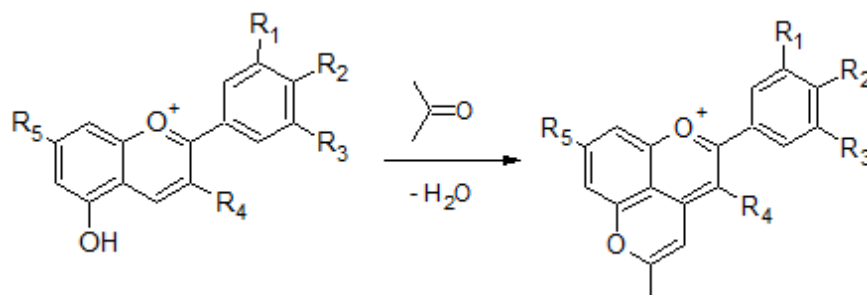


Obr. 14 Spektrum antokyaninů za použité SPE techniky

4.4 Pyranoantokyaniny

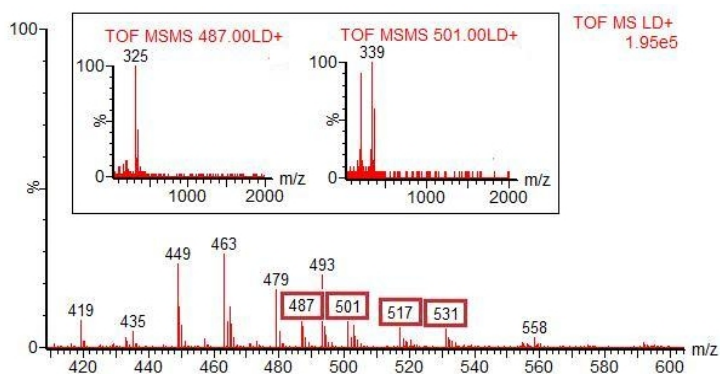
Pro analýzů anthokyaninových barviv z plodů lycia a vaccinia byly použity dvě extrakční rozpouštědla. Jako vhodnější se potvrdil okyselený metanol. Nicméně při vyhodnocování extraktu směsi acetonu a metanolu (1:1) okyselené 0,01% (v/v) kyselinou chlorovodíkovou byly nalezeny jiná anthokyaninová barviva známá jako pyranoantokyaniny.

Literatura uvádí, že pyranoantokyaniny vznikají oxidačním působením acetonu na antokyaniny jako chemikálie použité k analýze. Jejich vznik je znázorněn na obr. 15. Až do nedávna byl aceton doporučován jako rozpouštědlo pro kvalitní extrakci rostlinných částí pro analýzu antokyaninů.⁴⁶ Analyzou zimolezu byly identifikovány 5-methylpyranoantokyaniny m/z 487 a 501 po použití činidla methanol a aceton.⁴⁷

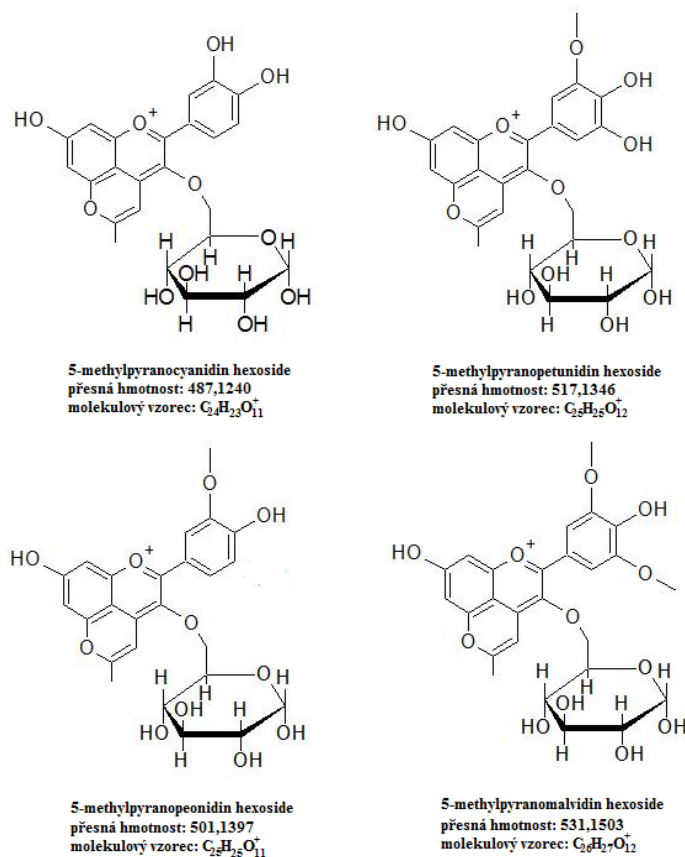


Obr. 15 Vznik pyranoantokyaninu z antokyaninu působením acetonu⁴⁵

Pomocí MALDI-MS byla zjištěna přítomnost čtyř pyranoantokyaninů ve spektru obou plodů. Jejich identifikace byla potvrzena pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie a výpočtu přesné molekulové hmotnosti (Obr. 17).

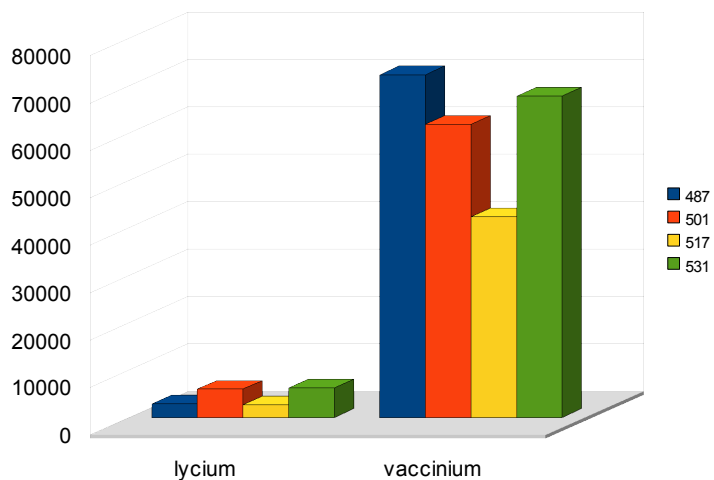


Obr. 16 Spektrum získaných pyranoantokyaninů ve vacciniu



Obr. 17 *Struktura čtyř pyranoantokyaninů a jejich přesné hmotnosti*

Jejich výčet a relativní chyby se nacházejí v tabulce V. Následující graf zobrazuje, který z pyranoantokyaninů, jenž byly semikvantitativně pozorovány ve spektru, je nejhojnější u námi analyzovaných plodů. Z grafu VII je patrné, že nejvyšší intenzity byly naměřeny u plodu vaccinia a že nejhojněji zastoupený pyranoantokyanin je 5-methylpyranocyanidin-3-hexosid (m/z 487), kde hrubě lze říci, že obsah je 30% v celém spektru pyranoantokyaninů u vaccinia. U lycia byl nejhojnější 5-methylpyranomalvidin-3-hexosid (m/z 531), který dosahoval 35%. Dále byly nalezeny i 5-methylpyranopeonidin-3-hexosid (m/z 501), 5-methylpyranopetunidin-3-hexosid (m/z 517).



Graf VII. *Pyranoantokyaniny v plodech*

V této analýze se látky nacházely v obou extrakčních činidlech, tedy v metanolovém i acetonovém roztoku, kde byly semikvantitativně pozorovány jejich intenzity a v obou činidlech. Studie prokazují, že látky, jenž jsou metylovány v poloze 5 mohou vznikat i přírodní cestou, kdy je cyklizačním činidlem kyselina acetoctová a syntéza kromě adice a oxidace obsahuje ještě dekarboxylační krok.⁴⁸ Proces vzniku pyranoanthokyaninových barviv je a dále bude předmětem i zájmem dalšího studia.

5. ZÁVĚR

V této práci byl studován antokyaninový profil dvou rostlin a to *Lycium chinense* a *Vaccinium myrtillus*, pomocí hybridní hmotnostní spektrometr Q-TOF Premier s ionizací typu MALDI. Plody byly analyzovány na několika úrovních. Pro analýzu byl plod rozdělen na dužinu a slupku, dále extahován ve dvou extrakčních činidel - 0,01 % (v/v) kyseliny chlorovodíkové v metanolu a směs acetonu a metanolu (1:1) okyselená 0,01% (v/v) kyselinou chlorovodíkovou, část byla přečištěná za použití Strata SPE kolonek. Metanolickeý roztok extrakčního činidla se prokázal jako nejvhodnější pro získání antokyaninových barviv z rostlinného materiálu.

V neposlední řadě byl analyzován plod jako kus slupky a část dužiny, v podobě pevné části obou plodů. Tato metoda poskytla srovnatelné výsledky jako při použití extrakce. Umožňuje tedy rychlý screening bez potřeby úpravy plodu.

V metanolickeém roztoku lycia se podařilo hrubě detekovat 15 antokyaninů, z čehož nejvyšší intenzitu zastoupení měl malvidin a jeho derivát. U vaccinia bylo detekováno 18 antokyaninů a nejhojněji zastoupený antokyaninový aglykon byl cyanidin. Studiemi potvrzený malvidin a jeho deriváty jako hlavní antokyanin u vaccinia byl v této analýze hrubě detekován jako druhý nejvíce se vyskytující anthokyanin. Použití SPE techniky významně nepřispělo k získání kvalitnějších výsledků.

Analýza plodů také prokázala, že hojnější přítomnost antokyanů ve slupce má lycium, zatímco vaccinium má vyšší intenzitu antokyanů právě v dužině. V pevných analyzovaných částech plodu lycia byl nejhojněji detekován delphinidin, u vaccinia byl opět potvrzen cyanidin jako při použití extrakce.

Tato práce dále prokázala přítomnost 4 pyranoantokyaninů – 5-methylpyranocyanidin-3-hexosid, 5-methylpyranopeonidin-3-hexosid, 5-methylpyranopetunidin-3-hexosid a 5-methylpyranomalvidin-3-hexosid, jejichž intenzity byly semikvantitativně pozorovány a v obou činidlech.

6. LITERATURA

¹ CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of mass spectrometry* [online]. 2004, vol. 39, iss. 4 [cit. 2011-03-21], s. 461-461

² ANDERSEN, O.M.; MARKHAM, K.R. *Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications*. Boca Raton : CRC Press, 2006. 1197 s. ISBN 0-8493-2021-6

³ SULLIVAN, J. *Anthocyanidin* [online]. 1998 [cit. 2011-03-24]. <<http://www.charlies-web.com/specialtopics/anthocyanin.html>>

⁴ BALÍK, J. *Anthokyaninová barviva v hroznech a vínech*. 1. vyd. Brno: Mendlova univerzita v Brně, 2010. 108 s. ISBN 978-80-7375-412-9

⁵ KONG, J.-M., et al. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* [online]. 2003, vol. 69, iss. 9 [cit. 2011-03-20], s. 1939-1940

⁶ JOSEPH, James A., et al. Reversals of Age-Related Declines in Neuronal Signal Transduction, Cognitive, and Motor Behavioral Deficits with Blueberry, Spinach, or Strawberry Dietary Supplementation. *The Journal of Neuroscience* [online]. 1999, vol. 19, iss. 18 [cit. 2011-03-22], s. 8114-8121

⁷ *E163 - Anthokyaniny*. [online]. [cit. 2011-03-22]. <<http://www.ukfoodguide.net/e163.htm>>

⁸ LOHACHOOMPOL, V.; SRZEDNICKI, G.; CRASKE, J. The Change of Total Anthocyanins in Blueberries and Their Antioxidant Effect After Drying and Freezing. *PubMed* [online]. 2004, iss. 5 [cit. 2011-03-22], s. 248-252

⁹ *Lycium chinense – Mill.* [online]. c1996-2010 [cit. 2011-03-13]. <<http://www.pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Lycium%20chinense>>

¹⁰ *Wolfberry festival to be held in Ningxia*. [online]. 2004, [cit. 2011-03-21].

<<http://www.chinadaily.com.cn/chinagate>>

¹¹ SUBHUTI , Dharmananda PhD. *Lycium fruit*. [online]. [cit. 2011-03-18].

<<http://www.itmonline.org/arts/lycium.htm>>

¹² *Boxthron* [online]. 2010 [cit. 2011-03-22]. <<http://en.wikipedia.org/wiki/Boxthron>>

¹³ *Wolfberry* [online]. 2009, [cit. 2011-03-22]. <<http://en.wikipedia.org/wiki/Wolfberry>>

¹⁴ WU, S-J; NG, L-T; LIN, Ch-Ch. Antioxidant Activities of Some Common Ingredients of Traditional Chinese Medicine, *Angelica sinensis*, *Lycium barbarum* and *Poria cocos*.

Phytotherapy research [online]. 2004, vol. 18, iss. 12 [cit. 2011-03-13], s. 1008-1012

¹⁵ ZHANG, R., et al. Cytoprotective effect of the fruits of *Lycium chinense* Miller against oxidative stress-induced hepatotoxicity. *Journal of ethnopharmacology* [online]. 2010, vol. 130, iss. 2 [cit. 2011-03-14], s. 299-306

¹⁶ KANG, M-H; PARK , W-J; CHOI, M-K. Anti-Obesity and Hypolipidemic Effects of *Lycium chinense* Leaf Powder in Obese Rats. *Journal of medicinal food* [online]. 2010, vol. 13, iss. 4 [cit. 2011-03-14], s. 801-807

¹⁷ JIA, YX, et al. The effect of *lycium barbarum* polysaccharide on vascular tension in two-kidney, one clip model of hypertension. *Department of Pathophysiology* [online]. 1998, vol. 50, iss. 3 [cit. 2011-03-13], s. 309-314

¹⁸ ADAMS, M. , et al. HPLC-MS trace analysis of atropine in *Lycium barbarum* berries. *Phytochemical analysis* [online]. 2006, vol. 17, iss. 5 [cit. 2011-03-13], s. 279-283

¹⁹ LI, Z; PENG G.; ZHANG S. Separation and determination of carotenoids in *Fructus lycii* by isocratic non-aqueous reversed-phase liquid chromatography. *Department of Food Science & Technology* [online]. 1998, vol. 16, iss. 54 [cit. 2011-03-13], s. 342-343

- ²⁰ SHIN, Y-G, et al. Determination of betaine in *Lycium chinense* fruits by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of chromatography A* [online]. 1999, vol. 857, iss. 1-2 [cit. 2011-03-18], s. 331-335
- ²¹ LEVER, M.; SLOW, S. The clinical significance of betaine, an osmolyte with a key role in methyl group metabolism. *Clinical biochemistry* [online]. 2010, vol. 43, iss. 9 [cit. 2011-03-18], s. 732-744
- ²² QIAN, J-Y.; LIU, D.; HUANG, A-G. The efficiency of flavonoids in polar extracts of *Lycium chinense* Mill fruits as free radical scavenger. *Food chemistry* [online]. 2004, vol. 87, iss. 2 [cit. 2011-03-18], s. 283-288
- ²³ SOCHOR, M. *Brusnice borůvka (Vaccinium myrtillus L.)*. [online]. 2010, [cit. 2011-03-22]. <http://botanika.borec.cz/brusnice_boruvka.php>
- ²⁴ CHEN, CF; LI, YD; XU, Z. Chemical principles and bioactivities of blueberry. *Institute of Pharmacology* [online]. 2010, vol. 45, iss. 4 [cit. 2011-03-24], s. 422-429
- ²⁵ MAZZA, G., et al. Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2002, vol. 50, iss. 26 [cit. 2011-03-22], s. 7731-7737
- ²⁶ *Guide to Solid Phase Extraction*. [online]. 1998, [cit. 2011-03-22]. <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>
- ²⁷ *SPE kolonky*. [online]. c1997-2011 [cit. 2011-03-22]. <<http://www.labicom.cz/spe-kolonky-81/>>
- ²⁸ Štulík K. a kol: *Analytické separační metody*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004. 264 s. ISBN 80-246-0852-9

²⁹ *Hmotnostní spektrometrie* [online]. 2009 [cit. 2011-03-13].

<http://cheminfo.chemi.muni.cz/chem_sekce/predmety/C7300/MS/ms.pdf>

³⁰ LENNON, John J. *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry*. [online]. 1997, [cit. 2011-03-22].

<<http://www.abrf.org/abrfnews/1997/june1997/jun97lennon.html>>

³¹ HAVLIŠ, J. Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF. *Vesmír* [online]. 1999, [cit. 2011-03-22].

³² *MALDI Mass*. [online]. c2011, [cit. 2011-03-22]. <<http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/spectroscopy/maldi-mass.html>>

³³ HOLČAPEK, M. *Hmotnostní analyzátořy*. [online]., [cit. 2011-04-15].

³⁴ VALENTINE, N.-B., et al. Direct surface analysis of fungal species by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid communication in mass spectrometry* [online]. 2002, vol. 16, iss. 14 [cit. 2011-05-08], s. 1352-1357

³⁵ PACÁKOVÝ V.; ŠTULÍK K. *Vykosoúčinná kapalinová chromatografie*. Praha : Státní pedagogické nakladatelství, 1986. 144 s

³² WANG, J.; KALT, W.; SPORNS, P. Comparison between HPLC and MALDI-TOF MS Analysis of Anthocyanins in Highbush Blueberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2000, vol. 48, iss. 8 [cit. 2011-03-22], s. 3330-3335

³⁷ FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J-A., et al. Quantitative changes in anthocyanin pigments of *Vitis vinifera* cv monastrell during maturation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 2006, vol. 58, iss. 1 [cit. 2011-03-19], s. 153–155

- ³⁸ MAZZA, G. Anthocyanins and Other Phenolic Compounds of Saskatoon Berries *Amelanchier alnifolia* Nutt.. *Journal of Food Science* [online]. 2006, vol. 51, iss. 5 [cit. 2011-03-19], s. 1260–1264
- ³⁹ NYMAN, N.A.; KUMPULAINEN, T. Determination of Anthocyanidins in Berries and Red Wine by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2001, vol. 49, iss. 9 [cit. 2011-03-19], s. 4183-4187
- ⁴⁰ *Tandem mass spectrometer* [online]., 1991 [cit. 2011-04-15].
<<http://goldbook.iupac.org/T06250.html>>
- ⁴¹ DONG, Jing Z.; LU, Da Y.; WANG, Y. Analysis of Flavonoids from leaves of cultivated *Lycium barbarum* L. *Plant Foods for human nutrition* [online]. 2009, vol. 64, iss. 3 [cit. 2011-04-12], s. 199-204
- ⁴² ZHENG, J., et al. Anthocyanins composition and antioxidant activity of wild *Lycium ruthenicum* Murr. from Qinghai-Tibet Plateau. *Food chemistry* [online]. 2010, vol. 126, iss. 3 [cit. 2011-04-08], s. 859-865
- ⁴³ LOHACHOOMPOL, V., et al. Determination of anthocyanins in various cultivars of highbush and rabbiteye blueberries. *Food chemistry* [online]. 2008, vol. 111, iss. 1 [cit. 2011-04-15], s. 249-254
- ⁴⁴ YOU, Q., et al. Comparison of anthocyanins and phenolics in organically and conventionally grown blueberries in selected cultivars. *Food chemistry* [online]. 2011, vol. 125, iss. 1 [cit. 2011-04-15], s. 201-208
- ⁴⁵ ZU, X.Y., et al. Anthocyanins extracted from Chinese blueberry (*Vaccinium uliginosum* L.) and its anticancer effects on DLD-1 and COLO205 cells. *Chinese medical journal* [online]. 2010, vol. 123, iss. 19 [cit. 2011-04-15], s. 2714-2719

⁴⁶ LU, Y.R.; FOO, L.Y. Unusual anthocyanin reaction with acetone leading to pyranoanthocyanin formation. *Tetrahedron letters* [online]. 2001, vol. 42, iss. 7 [cit. 2011-04-15], s. 1371-1373

⁴⁷ MYJAVCOVÁ, R., et al. Analysis of anthocyanin pigments in *Lonicera* (*Caerulea*) extracts using chromatographic fractionation followed by microcolumn liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of chromatography* [online]. 2010, vol. 1217, iss. 51 [cit. 2011-04-15], s. 7932-7941

⁴⁸ HE, J.R. , et al. Isolation and quantification of oligomeric pyranoanthocyanin-flavanol pigments from red wines by combination of column chromatographic techniques. *Journal of chromatography* [online]. 2006, vol. 1134, iss. 1-2 [cit. 2011-04-23], s. 215-225

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

<u>Zkratka</u>	<u>Termín</u>
MALDI	matrix-assisted laser desorption/ionization
Q-TOF	kvadrupólový hmotnostní analyzátor - time-of-flight
SPE	solid phase extraction
UV	ultra violet
DNA	deoxyribonucleonic acid
HPLC	high performance liquid chromatography
MS	mass spectrometry
ESI	electrospray ionization
LD	lethal dose
EI	electron ionization
CI	chemical ionization
THAP	2',4',6'-trihydroxyacetophenon
LC	liquid chromatography
APCI	atmospheric-pressure chemical ionization
DAD	diode-array detection
MSMS, MS ²	tandem mass spectrometry
UPLC	ultra performance liquid chromatography
např.	například
obr.	obrázek