UNIVERZINA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra analytické chemie

Studium vlivu těžkých kovů na profil sekundárních metabolitů v luštěninách spojením kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce: Bc. Roman Fryčák

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Petr Bednář, Ph.D.

Olomouc 2017

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, 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…….

…….

Vlastnoruční podpis

Shrnutí:

Tato práce se zabývá vlivem těžkých kovů a jejich koncentrace na obsah flavonoidů ve dvou odrůdách fazolu. Teoretická část shrnuje poznatky o složení plodů rostlin, metodách extrakce flavonoidů z rostlinného materiálu, jejich separace a detekce. Experimentální část je věnována přípravě extraktů rostlinného materiálu a jejich analýze. Identifikace a kvantifikace jednotlivých flavonoidů byla provedena metodou kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Dále byl porovnáván vliv jednotlivých kovů a jejich koncentrací na rostliny a rostliny mezi sebou. Bylo zjištěno, že na zvyšující se koncentraci Ni a Zn reagují obě odrůdy shodně, ale na zvyšující se koncentraci Cr a Cu reagují rozdílně. U odrůdy Carmen dochází k nárůstu flavonoidů, zatímco u odrůdy Blauhilde k poklesu.

Klíčová slova: flavonoidy, těžké kovy, fazol obecný, antioxidanty, UHPLC, MS, QqQ, QqTOF

Summary:

This theses deals with the influence of heavy metals and thein concentration on the kontent of flavonoids in two varieties of bean. The teoretici part summarizes knowlage about plant fruit composition, methods of flavonoid extraction from plant material, thein separation and detection. The experimental part is devoted to preparation of extracts of plant material and their analysis. Identification and quantification of individual flavonoids was performed by tandem mass spectrometry liquid chromatography. Furthermore, the influence of individual metals and their concentrations on plants and plants was compared. It has been found that both varieties react identically to the increasing concentration of Ni and Zn, but they react differently to the increasing concentration of Cr and Cu. In the Carmen variety, flavonoids increase, whereas in the Blauhilde variety, they decline.

Keywords: flavonoids, heavy metals, bean, antioxidants, UHPLC, MS, QqQ, QqTOF

Obsah

1 Úvod 1

2 Teoretická část 2

2.1 Těžké kovy 2

2.2 Popis rostliny 2

2.3 Složení plodů 3

2.3.1 Bílkoviny 3

2.3.2 Sacharidy 3

2.3.3 Tuky 4

2.3.4 Vitamíny 4

2.3.5 Minerální látky 4

2.3.6 Antinutriční látky 5

2.4 Flavonoidy 5

2.4.1 Biochanin A 6

2.4.2 Daidzein 6

2.4.3 Formononetin 6

2.4.4 Genistein 6

2.4.5 Kaempferol 6

2.4.6 Quercetin 7

2.4.7 Rutin 7

2.5 Úprava vzorků - extrakce 7

2.5.1 Extrakce pevná látka – kapalina (SLE, Liguid-Solid Extraktion) 7

2.5.2 Tlaková kapalinová extrakce (PLE, Pressurised Liquid Extraction) 8

2.5.3 Superkritická fluidní extrakce (SFE, Supercritical Fluid Extraction) 9

2.5.4 Mikrovlnná extrakce (MAE, Microwave Assistend Extraction) 10

2.5.5 Extrakce ultrazvukem (UAE, Ultrasound Assisted Extraction) 10

2.5.6 Hydrolýza 10
2.6 Čištění a izolace analytů 11
2.6.1 Extrakce kapalina-kapalina (LLE, Liquid-Liguid Extraction) 11
2.6.2 Extrakce na tuhou fázi (SPE; Solid Phase Extraaction) 12
2.6.3 Extrakce disperzní tuhou fází (MSPD, Matrix Solid-Phase Dispersion) 12
2.7 Metody detekce 13
2.7.1 Spektroskopické stanovení 13
2.7.2 Fluorescenční spektrometrie 15
2.7.3 Hmotnostní spektrometrie 16
2.7.4 Elektrochemické metody 17
2.8 Analytické metody pro stanovení flavanoidů 19
2.8.1 Chromatografie na tenké vrstvě (TLC, Thin-Layer Chromatography) 19
2.8.2 Plynová chromatografie (GC, Gas Chromatography) 20
2.8.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC – Hight Performance Liquid Chromatography) 21
2.8.4 Kapilární elektroforéza (CE – Capilary Electrophoresis) 21
3 Experimentální část 22
3.1.1 Použité chemikálie 22
3.1.2 Analyzované vzorky 23
3.1.3 Vybrané druhy rostlin 23
3.1.4 Podmínky pěstování 23
3.1.5 Výběr těžkých kovů a koncentrace použitých roztoků 23
3.1.6 Klimatické podmínky 24
3.1.7 Odběr a zpracování vzorku 24
3.1.8 Extrakce 25
3.1.9 Metoda stanovení 25

3.1.10 Stanovení identifikovaných flavonoidů 26
4 Výsledky a diskuze 29
4.1 Identifikované flavanoidy 29
4.1.1 Biochanin A 29
4.1.2 Daidzein 31
4.1.3 Daidzeinhexosid 33
4.1.4 Formononetin 35
4.1.5 Genistein 36
4.1.6 Kaempferol 38
4.1.7 Kaempferol 3-O-)malonyl)glucoside 40
4.1.8 Kaempferol 3-O-glukuronid 41
4.1.9 Kaempferolmethylpentosylhexosid 43
4.1.10 Kaempferolhexosylpentosy 44
4.1.11 Quercetin 46
4.1.12 Quercetin 3-O-(malonyl)glucoside 47
4.1.13 Quercetin 3-O-xylosylglucoside 49
4.1.14 Quercetinhexosid 50
4.1.15 Quercetinxylosylrutinosid 52
4.1.16 Quercetinmethylpentosylhexosy 53
4.2 Kvantifikace 55
4.2.1 Chróm 55
4.2.2 Měď 59
4.2.3 Nikl 62
4.2.4 Zinek 65
5 Závěr 69
6 Literatura 69

7 Seznam zkratek 72

1 Úvod

Znečištění životního prostředí těžkými kovy je globálním problémem. Těžké kovy se ve formě rozpustných iontů dostávají do těl rostlin, kde se akumulují a mohou se tak dostávat dále do potravního řetězce. Jejich vysoké koncentrace negativně ovlivňují fyziologické funkce rostlin a vyvolávají oxidativní stres. Rostliny se brání zvýšenou produkcí antioxidačních enzymů a antioxidantů, mezi které se řadí i flavonoidy. Změna obsahu flavonoidů v rostlinách nás může upozornit na špatnou výživovou hodnotu dané rostliny. Tato práce je zaměřena na sledování změn v obsahu flavonoidů u rostlin, které byly v průběhu svého života vystaveny rozdílné koncentraci kovu v půdě. Důležitou součástí této práce je porovnání vlivů koncentračních řad vybraných těžkých kovů na rostliny a srovnání dvou odrůd fazolu obecného.

2 Teoretická část

2.1 Těžké kovy

Těžké kovy jsou rozsáhlou skupinou prvků, jejichž definice se v literatuře značně liší. Nejčastěji jsou za těžké kovy označované prvky s hustotou větší než 5 $g \cdot cm^{-3}$. Jejich přítomnost v životním prostředí je v nízkých koncentracích přirozenou[1]. Do půdy a vod se dostávají erozí hornin bohatých na tyto kovy (přírodní zdroje). Často se jedná o esenciální prvky, které jsou v malých koncentracích nezbytné pro život rostlin i živočichů. Vyšší koncentrace mají toxické účinky. Těžké kovy jsou hojně využívány v moderních technologiích. K nadměrnému znečištění životního prostředí dochází především při těžbě, průmyslovém zpracování, spalovacích procesech, ale i v zemědělství, kde jsou těžké kovy součástí pesticid, nebo čistírenských kalů využívaných jako hnojivo (environmentální zdroje)[2]. K narůstající kontaminaci životního prostředí těžkými kovy přispívá i jejich stabilita a s tím spojená akumulace.

V půdě jsou těžké kovy obsaženy v různých formách, například jako rozpustné ionty, které se následně vstřebávají do rostlin. Fytotoxicita těžkých kovů spočívá například v ovlivňování metabolizmu rostlin, vstřebávání vody a minerálů kořenem, inaktivací enzymů, nebo vazbou na proteiny. Nadbytek těžkých kovů v rostlině také způsobuje vznik volných kyslíkových radikálů, které rozkládají proteinové řetězce a ovlivňují funkci buněčných membrán. Těžké kovy jsou akumulovány ve vakuolách rostlin[3;4;5].

Rostliny tvoří významnou část potravy většiny živočichů včetně člověka. Těžké kovy ze životního prostředí se tak skrze rostliny dostávají do těl živočichů.

2.2 Popis rostliny

Fazol obecný (*Phaseolus vulgaris* L.) je svou klasifikací zařazen mezi cévnaté krytosemenné rostliny, třídy vyšších dvouděložných rostlin, řádu bobotvaré, čeledi bobovité a rodu fazole. Fazol je rozšířen a pěstován po celém světě, vyjma Antarktidy. Tento rod zahrnuje mnoho kultivarů, které se od sebe mohou díky svému dlouhodobému šlechtění výrazně lišit. Rozeznáváme dvě základní formy fazolu a to: fazol keříčkovitý, který tvoří keř s výškou 20 – 60 cm a fazol popínavý, který je popínavou rostlinou dosahující délky 2 – 3 metry. Fazol tvoří většinou oválné listy zelené, či fialové barvy, tvořené třemi lístky. Květy fazolu jsou přibližně 1 cm velké, uspořádané v chudém hroznu a můžou mít fialovou,

růžovou, žlutou, nebo bílou barvu. Plodem je 8 – 20 cm dlouhý křehký různobarevný (zelený, žlutý, fialový, žíhaný) lusk, obsahující 4 – 6 semen ledvinovitého, nebo kulovitého tvaru o velikosti až 1,5 cm s různou barevností (černé, fialové, červené, žluté, bílé). Fazol je teplomilná rostlina, která vyžaduje dostatek slunce, popřípadě polostín. Klíčení semen probíhá v rozmezí 6 – 8 °C a rostlina roste při teplotě přesahující 9 °C. Optimální teplota pro růst fazolu je 20 – 25 °C[6].

Luskoviny jsou hospodářsky významné rostliny, mezi které spadá i fazol. Semena těchto rostlin se označují jako luštěniny a dlouhodobě zaujímají důležité místo ve výživě člověka jak v rozvinutých, tak i v rozvojových zemích. Nejvíce luštěnin, především pak fazolí, se tradičně konzumuje v Mexiku, Karibiku a ve státech Latinské Ameriky a Subsaharské Afriky. Průměrná celosvětová spotřeba luštěnin je 7 kg/osoba/rok. Evropský průměr je zhruba poloviční a spotřeba luštěnin v ČR je 2,5 kg/osoba/rok[7].

2.3 Složení plodů

2.3.1 Bílkoviny

Semena luskovin jsou známá svým vysokým obsahem proteinů ve srovnání s ostatními rostlinnými potravinami. Lze je tedy zařadit mezi tzv. bílkovinné potraviny. Obsah bílkovin v syrových semenech fazolu se pohybuje v rozmezí 20 – 25 %. Bílkoviny v luštěninách jsou svým složením podobné bílkovinám pocházejícím z živočišných zdrojů, nejsou však plnohodnotnou náhradou masa díky malému obsahu sirných aminokyselin (metioninu, cysteinu a tryptofanu). Nejvíce zastoupenými aminokyselinami je glutamin, asparagin, kyselina asparagová a glycin. Většina proteinů se v luštěninách vyskytuje ve formě globulinu, nebo zásobních proteinů, které jsou syntetizovány během vývoje semen k zajištění dostatečných zásob dusíku a uhlíku při klíčení. Hlavním zásobním proteinem v semeni fazolu je phaseolin, který je také hlavním ukazatelem kvality a nutriční kvality proteinů v semeni fazolu[8-10].

2.3.2 Sacharidy

Semena luštěnin jsou z velké části tvořena sacharidy. Obsah sacharidů v suchém semeni fazolu je 52 - 60 % a jsou složeny z monosacharidů, disacharidů, oligosacharidů a polysacharidů. V průběhu vývoje rostliny se zastoupení jednotlivých složek výrazně liší,

například nezralá semena mají daleko vyšší obsah jednoduchých cukrů a nižší obsah nestravitelných polysacharidů, než je tomu u semen suchých. Největší měrou je zastoupen škrob, který může tvořit až 57 % z celkového množství sacharidů v semeni fazolu. Škrob je polysacharidem, který má v rostlině zásobní funkci. Z výživového hlediska rozlišujeme mezi rychle stravitelným a pomalu stravitelným škrobem, které jsou štěpitelné a využitelné v tenkém střevě, a rezistentním škrobem, který je metabolizován mikroflórou tlustého střeva a způsobuje plynatost. Dalšími pro člověka nestravitelnými polysacharidy obsaženými ve fazolích jsou celulóza, hemicelulóza, lignin a polysacharidy neškrobového původu, souhrnně označované jako vláknina. Vláknina se vyskytuje především v luscích fazolu[8,9,11].

2.3.3 Tuky

Obsah tuků je v luštěninách obecně velice malý, pohybuje se v rozmezí 1- 1,5 %. U fazolu druhu adzuki je obsah tuku dokonce jen 0,1 %. Složení mastných kyselin je velice příznivé, až 85 % tvoří nenasycené mastné kyseliny. U fazolí je největší měrou zastoupena kyselina linolová a to až 53 %. Obsah a složení tuků je velice závislé nejen na odrůdě, ale také na klimatu, období, místě růstu, typu půdy a environmentálních faktorech[8,9].

2.3.4 Vitamíny

Luštěniny jsou dobrým zdrojem ve vodě rozpustných vitamínů, naopak jsou chudé na vitamíny rozpustné v tucích. Nejvíce zastoupenou skupinou vitamínů v luštěninách jsou vitamíny skupiny B a to téměř celým komplexem s výjimkou vitaminu B_{12} (kobalaminu). Dále lze v luštěninách nalézt provitamin A, vitamin E a kyselinu listovou. Obsah vitaminu C je v suchých semenech malý, ale při klíčení jeho obsah vzrůstá až na hodnoty, které se blíží jeho obsahu v citrusových plodech. V luscích lze nalézt také niacin a kyselinu pantothelovou[8,9,12].

2.3.5 Minerální látky

Luštěniny jsou dobrým zdrojem minerálních látek a to především P, K, Mn, Cu, Zn, I, Ca a Co. Biologická dostupnost těchto kovů může být snížena navázáním na kyselinu fytovou, šťavelovou a jiné látky. Luštěniny jsou velice chudé na sodík. Obsah minerálních látek závisí na půdě a podmínkách, za kterých je rostlina pěstována[12,13].

2.3.6 Antinutriční látky

Kromě pozitivně působících látek se v luštěninách vyskytuje i množství jiných sloučenin, které jsou pro člověka nestravitelné, nebo jsou přímo škodlivé až toxické. Může se jednat například o antivitaminy, což jsou látky snižující účinky, či biodostupnost přijímaných vitamínů. Stejně tak luštěniny obsahují kyselinu šťavelovou a fytovou, které na sebe váží minerální látky a odvádí je z organizmu. Další skupinou látek obsažených v luštěninách jsou saponiny, které mohou způsobovat rozpad červených krvinek a uvolnění hemoglobinu do krevního řečiště. Jedovatou látkou obsaženou v syrových fazolích je fytohemaglutinin patřící do skupiny lektinů. Otravu může vyvolat i méně než pět syrových fazolí a projevuje se nevolností, zvracením, křečemi a průjmem. Příznaky obvykle odezní do pěti hodin. Některé druhy fazolí mohou taky obsahovat kyanogenní glykosidy, jejichž hydrolýzou vzniká kyanovodík. Například fazol měsíční může poskytnout až 17 mg HCN/ 100g. Většina nežádoucích látek ve fazolích je termolabilních a tak při správné tepelné úpravě nemůže dojít k otravě[8,9,13,14].

2.4 Flavonoidy

Flavonoidy jsou sekundárními metabolity rostlin patřící do skupiny fenolů. Ve své molekule obsahují dva benzenové kruhy spojené tříuhlíkovým řetězcem v uspořádání C_6-C_3-C_6. Struktura flavonoidů je odvozena od flavanu, který je různě substituován a to nejčastěji hydroxyskupinou, nebo methoxyskupinou. Jednotlivé deriváty se liší stupněm substituce, nebo oxidace. Podle stupně oxidace rozlišujeme základní skupiny flavonoidů: anthokyanidy, leukoanthokyanidiny, flavanony, flavanoly, flavony, flavonoly a katechiny. Nejrozšířenější skupinou jsou flavonoly. V přírodě se flavonoly běžně vyskytují ve formě glykosidů. Struktura glykosylované formy je tvořena samotným flavonoidem a na něm navázaným cukernatým zbytkem. Nejčastěji dochází k navázání na uhlíku C_3[15,16].

Flavonoidy jsou důležitými antioxidanty, tedy látkami, které jsou schopny zabraňovat vzniku volných radikálů a vázat ionty některých kovů. Antioxidační aktivita jednotlivých flavonoidů je závislá na poloze a počtu hydroxylových skupi a jejich glykosylaci. Flavonoidy vykazují značnou biologickou a farmakologickou aktivitu. Mají především protizánětlivé, antialergení, antivirové a antikarcerogení účinky[15.16].

2.4.1 Biochanin A

Biochanin A je přírodní látkou patřící do skupiny isoflavonů, kterou lze nalézt v jeteli červeném, sóji, arašídech, cizrně a luštěninách. Je klasifikován jako mírný fytoestrogen. Byly zkoumány jeho rozmanité účinky, například na zmírnění neurolepticích bolestí, zmírnění neurodegenerativních onemocnění jako je Parkinsonova nemoc a preventivní účinky proti některým druhům rakoviny. Dále pak byl zkoumán jeho pozitivní vliv proti úbytku kostní tkáně[17-20].

2.4.2 Daidzein

Daidzein patří mezi izoflavony a díky své estrogenní aktivitě se řadí mezi fytoestrogeny. Vyskytuje se především v jeteli červeném, kudzu, sojových bobech, ale i jiných luštěninách. daidzein má velkou antioxidační aktivitu a slabé estrogenní a anti-estrogenní účinky, díky nimž působí proti rakovině prostaty, osteoporóze a ateroskleróze. Diadzein se používá v tradiční čínské medicíně jako lék proti alkoholismu[21].

2.4.3 Formononetin

Formononetin je další látkou patřící mezi izoflavony. Vyskytuje se v řadě rostlin a bylin, zejména pak v luštěninách a to hlavně ve fazolích a sóje. Dále se vyskytuje také v jeteli červeném. U formononetinu byly studovány jeho antimykotické a antibakteriální účinky. Dále také působí proti rakovině prsu, prostaty a tlustého střeva, pozitivně působí při hojení ran a kostí[22].

2.4.4 Genistein

Genistein taktéž patří mezi izoflavany a řadí se tak do skupiny fytoestrogenů. Jeho název pochází od rostliny *Genista tinctoria* (Kručivka barvířská), ze které byl v roce 1899 izolován. Dále jej lze nalézt ve fazolích, sóje, kávě a různých léčivých bylinách. Genistein působí jako antioxidant, anthelmintikum, proti artróze a jako inhibitor nádorového bujení u rakoviny prostaty, prsu, děložního čípku a tlustého střeva[23].

2.4.5 Kaempferol

Kaempferol je jedním z nejdůležitějších a nejrozšířenějších flavanoidů. Můžeme ho nalézt například ve špenátu, cibuli, rajčatech, fazolích, malinách a v mnoha jiných zdrojích. Je znám svou velkou antioxidační aktivitou a je schopen inhibovat bujení rakovinných buněk.

Kaempferol také působí proti diabetu, kardiovaskulárním onemocněním a má antivirální a antimikrobiální účinky. Při podávání s quercetinem působí synergicky[24].

2.4.6 Quercetin

Quercetin je dalším široce rozšířeným flavanoidem. V největším množství se vyskytuje ve fazolích, kapary, šťovíku, ředkvičkách, ale i v čajích, brusinkách a dalších. Je silným antioxidantem, má anti-alergenní a proti zánětlivé účinky. Může pomáhat v léčbě a prevenci diabetu, snižováním hladiny cukru v krvi. Dále může působit proti kardiovaskulárním onemocněním a rakovinnému bujení buněk[25,26].

2.4.7 Rutin

Rutin je glykosylovanou formou quercetinu. Navázaným cukrem je v tomto případě disacharid rutinosa, jedná se o Quercetin-3-O-rutinosid. Jeho název pochází od rostliny *Ruta graveolens* (Ruta vonná), v které je obsažen. Hojně se vyskytuje v citrusových plodech, drobném ovoci, čaji, fazolích, chřestu, pohance a černých olivách. Díky svým silným antioxidačním vlastnostem, účinku proti různým druhům rakoviny a účinku proti stárnutí je rutin hojně využíván ve farmacii[27].

2.5 Úprava vzorků - extrakce

Obsah flavanoidů je nejčastěji sledován v rostlinných matricích, které jsou pro analýzu značně složité. Neexistuje způsob stanovení, kterému by nepředcházela úprava vzorku, či extrakce analyzované látky z dané matrice. Extrakční metodu volíme dle charakteru chystané analýzy. Je zapotřebí rozlišit mezi analýzou jedné konkrétní látky, kdy volíme metodu s co největší selektivitou k danému analytu, a mezi analýzou celkového chemického profilu stanovovaného vzorku. Snahou současné doby je nalézt takovou extrakční metodu, která bude kvantitativní a reprezentativní s ohledem na analyzované látky a zároveň bude rychlá, jednoduchá, ekologická a levná s možností automatizace a propojení s analytickou koncovkou[28-31].

2.5.1 Extrakce pevná látka – kapalina (SLE, Liguid-Solid Extraktion)

Extrakce pevná látka – kapalina je díky jednoduchosti svého provedení jednou z nejčastěji využívaných extrakčních technik pro extrakci fenolických látek. Prvním krokem této extrakce je dokonalá homogenizace vzorku tak, aby plocha přicházející do styku s kapalinou byla co největší. Pro homogenizaci suchých vzorků lze využít kulových, či jiných

mlýnků, popřípadě lze vzorek rozetřít v třecí misce. Vzorky, které nejsou dokonale vysušeny, bývají při homogenizaci mazlavé, v takovém případě lze využít mražení suchým ledem, či kapalným dusíkem. Následujícím krokem je volba vhodného rozpouštědla. Nejpoužívanějšími rozpouštědly pro extrakci fenolických sloučenin z rostlinného materiálu jsou metanol, etanol, acetonitril, jejich vodné roztoky a jejich kombinace. Ojediněle se lze setkat i s extrakcemi dichlormethanem či dimethylsulfoxidem. Postupy založené na kyselé hydrolýze využívají pro extrakci rozpouštědel s přídavkem HCl, kdy koncentrace kyseliny může značně ovlivnit výsledek extrakce a proto je tento proces nutno optimalizovat[31,32].

Dalšími parametry, které je nutno optimalizovat je teplota a čas extrakce. Teplotu je třeba volit tak, aby nedocházelo k degradaci analyzované látky. Doba extrakce se nejčastěji pohybuje v rozmezí několika minut, ale nejsou výjimkou ani extrakce trvající až 24 hodin. Při takto dlouhých extrakcích se zvyšuje riziko oxidace fenolických látek a je proto vhodné přidávat do rozpouštědla redukční činidlo, nebo pracovat v inertní atmosféře.

Extrakce pevná látka – kapalina není selektivní a výsledný extrakt je směsí látek, které je nutno před následující analýzou dále čistit, či separovat.

Optimalizace extrakčních podmínek, v kombinaci s různými homogenizačními systémy, byly studovány a popsány v práci Rodrigueze-Bernaldo de Quirós z Univerzity of Santiago the Compostela. Tato práce se zaměřila na extrakci fenolických látek z červených a hnědých řas určených k lidské spotřebě. Výsledkem byla validovaná metoda s dobrou opakovatelností a výtěžností[31-34].

2.5.2 Tlaková kapalinová extrakce (PLE, Pressurised Liquid Extraction)

Tlaková kapalinová extrakce je modifikací extrakce pevná látka – kapalina. Jedná se o relativně novou metodu, poprvé představenou v roce 1995. Podstatou extrakce je zvýšení teploty rozpouštědla nad jeho bod varu (40-200°C) a zároveň zvýšení tlaku (10-15 MPa) tak, aby rozpouštědlo zůstalo v kapalném stavu. Díky takto nastaveným podmínkám dojde ke zlepšení rozpouštěcí kapacity a snížení viskozity rozpouštědla, zvýšení extrakční kinetiky, usnadnění uvolnění analyzované látky z matrice a zvýšení schopnosti penetrace rozpouštědla do matrice vzorku, dále dochází ke snížení povrchového napětí analytu, rozpouštědla i matrice. Všechny tyto vlastnosti umožňují zkrácení doby extrakce na cca 5-20 minut a zároveň snížení množství potřebného rozpouštědla[35,36].

Samotný proces probíhá v patroně z nerezové oceli, která je naplněna vzorkem a následně rozpouštědlem. Po dokončení procesu extrakce dojde k vytlačení extraktu z patrony stlačeným plynem, nejčastěji dusíkem.

Pro PLE extrakci je využíváno organických rozpouštědel, jejich kombinací, nebo vodných roztoků. Pokud pro extrakci použijeme jako rozpouštědlo vodu při teplotě 100-374°C a tlaku, bude se jednat o extrakci stlačenou horkou vodou (PHWE). Voda se vzrůstající teplotou a tlakem významně mění své vlastnosti a to především dielektrickou konstantu (míru polarity). Při teplotě okolo 250°C se hodnota její dielektrické konstanty blíží hodnotě pro metanol[37].

2.5.3 Superkritická fluidní extrakce (SFE, Supercritical Fluid Extraction)

Superkritická fluidní extrakce je preparační technika, která pro extrakci analytu z matrice vzorku využívá vlastností nadkritických tekutin. Nadkritickým stavem tekutin je stav, kdy tlak i teplota přesahují kritické hodnoty. V tomto stavu se stírají rozdíly mezi kapalinou a plynem. Tekutina má hustotu blízkou kapalinám, ale difúzní konstantu a viskozitu plynů. Má tedy vysokou rozpouštěcí schopnost a zároveň umožňuje rychlý přesun hmoty[38].

Nejčastěji využívaným superkritickým rozpouštědlem je oxid uhličitý a to pro jeho snadno dosažitelné kritické hodnoty (T_k = 31,3°C; p_k = 7,38 MPa). Superkritický CO_2 je nepolární rozpouštědlo, podobné hexanu, nejlépe tedy rozpouští nepolární, či málo polární látky. Přesto, že změnou teploty a tlaku můžeme měnit rozpouštěcí sílu superkritického CO_2 a upravovat tak selektivitu extrakce, není zcela vhodným rozpouštědlem pro fenolické látky. To lze ovšem změnit přídavkem malého množství modifikátoru (organického rozpouštědla, pro zvýšení polarity. Fenolické látky lze dobře extrahovat superkritickým CO_2 s přídavkem 1-10% metanolu, v potravinářství bývá pro svou toxicitu nahrazen etanolem[29].

Superkritická fluidní extrakce je levná, časově nenáročná a díky použití CO_2 taky ekologická extrakční metoda. Po ukončení extrakce a snížení tlaku v extraktoru dojde ke zplynění CO_2 a jeho úniku do atmosféry, dostáváme tedy objemově malé množství extraktu. Další výhodou této metody je možnost on-line spojení s plynovou, kapalinovou, nebo superkritickou fluidní chromatografií[39].

Vhodnost metody superkritické fluidní extrakce pro průmyslové využití, při extrakci antioxidačních látek z vybraných druhů brazilských rostlin, byla zkoumána na University of

Campinas. Bylo zjištěno, že pro extrakci antioxidantů z většiny zkoumaných druhů rostiln je nejvhodnější přídavek modifikátoru a co 10% (v/v) etanolu. Pouze v případě extrakce antioxidantů z fazolí a trubatky je vhodnější extrakce samotným CO2[29,39].

2.5.4 Mikrovlnná extrakce (MAE, Microwave Assistend Extraction)

Mikrovlnná extrakce je pokročilou a rychlou technikou s vysokou extrakční účinností a malou spotřebou rozpouštědel. Je často využívána pro extrakci analytů z rostlinných matric. Není vhodná pro termolabilní látky a to z toho důvodu že je založena na principu rychlého ohřevu polárních sloučenin, které jsou schopny absorbovat energii mikrovlnného záření. Pro extrakci se tedy nejčastěji využívá polárních rozpouštědel, ale je možno využít i rozpouštědel nepolárních, v tomto případě je zahříván polární analyt, který se následně uvolňuje z matrice vzorku do studeného rozpouštědla[31,33,34].

Pro extrakci flavanoidů ze Škornice (*Herba Epimediia)* byla využita v práci vědců z čínské Jilin University mikrovlnná extrakce. Metoda byla následně srovnána s dalšími extrakčními metodami, Soxhletovou extrakcí a extrakcí ultrazvukem. V této studii dosahovala mikrovlnná extrakce nejlepších výsledků, co se týče výtěžnosti a časově byla nejkratší[40].

2.5.5 Extrakce ultrazvukem (UAE, Ultrasound Assisted Extraction)

Ultrazvuková extrakce je velice spolehlivá, jednoduchá, technicky i finančně nenáročná metoda. Využívá akustických vln, o frekvenci okolo 40 Hz a výkonem okolo 70 W, díky nimž vznikají mechanické vibrace, které způsobují kavitaci. Kavitace je jev, při kterém dochází ke vzniku a zániku mikrobublinek v kapalinách, což lokálně způsobuje velké tlakové a teplotní výkyvy. Tyto změny pak narušují buněčné membrány a umožňují tak přechod analytu z matrice do rozpouštědla[30,31,41].

Porovnání ultrazvukové extrakce a tradičních průmyslových metod, pro získání extraktu polyfenolických látek z černého čaje, bylo provedeno na německé Clausthal University of Technology. Bylo zjištěno, že ultrazvuková extrakce dosahuje v některých případech vyšší extrakční schopnosti polyfenolických látek z rostlinné matrice a to až o 35% vůči běžným postupům dosud využívaným v průmyslu[41].

2.5.6 Hydrolýza

Při stanovování flavanoidů je důležité se rozhodnout, zda bude analýza zaměřena na konjugované formy polyfenolických látek, jak jsou například glykosidy, nebo na analýzu

vstřebatelnější formy fenolických látek, což jsou aglykosidy. Stanovení aglykosidů, polyfenolických látek bez cukerných zbytků, předchází krok hydrolýzy, při kterém dochází k přerušení glykosidových, nebo sulfátových vazeb.

Tento proces přirozeně probíhá enzymaticky ve střevech člověka. V laboratoři lze docílit hydrolýzy enzymaticky za použití β-glukosidásy, nebo β-glukoronidásy v octanovém pufru. Další možností je kyselá hydrolýza za pomocí HCl, nebo alkalická hydrolýza pomocí NaOH[29,34].

2.6 Čištění a izolace analytů

Rostlinné matrice jsou často velice složité na analýzu a to především díky velkému množství látek v surovém extraktu, které mohou interferovat s námi stanovovaným analytem. Krok čištění, či zkoncentrování extraktu může vést k odstranění balastních látek a tím ke zvýšení selektivity metody stanovení. Pro čištění fenolických sloučenin se využívá především extrakce na tuhé fázi, nebo extrakce kapalina-kapalina. Dále je možné využít sloupcové chromatografie, nebo chromatografie na tenké vrstvě.

2.6.1 Extrakce kapalina-kapalina (LLE, Liquid-Liguid Extraction)

Extrakce kapalina-kapalina je velice jednoduchou extrakční metodou. Princip této metody spočívá v selektivním přechodu analyzované látky přes fázové rozhraní mezi dvě vzájemně nemísitelné kapaliny. Jedna z kapalných fází je založena na vodném roztoku. Pro lepší extrakci polyfenolických látek jde nejčastěji o roztok metanol-voda, nebo etanol-voda. Pro extrakci nepolárních látek slouží méně polární rozpouštědla, jako je například dichlormethan, hexan, chloroform, nebo benzen. V této nepolární fázi jsou rozpouštěny především vosky, oleje, steroly a chlorofyl. Mimo složení obou navzájem nemísitelných kapalin jsou klíčové faktory ovlivňující separaci především hodnota pH, teplota, poměr obou kapalin, nebo délka a počet opakování extrakčního cyklu[29,30,35].

Hlavními nevýhodami této extrakční techniky může být vyšší spotřeba organických rozpouštědel a tvorba emulzí na fázovém rozhraní kapalin. Emulze vznikají díky tendenci některých sloučenin hromadit se na fázovém rozhraní a zabraňují pak úplnému oddělení obou roztoků. Vzniku emulze může zabránit přídavek soli do rozpouštědel, sůl je následně nutno z roztoku odstranit.

2.6.2 Extrakce na tuhou fázi (SPE; Solid Phase Extraaction)

Extrakce na tuhé fázi je vysoce selektivní, relativně levná, rychlá a dobře reprodukovatelná metoda separace analytů z kapalných, či plynných vzorků. Mechanizmus separace je shodný s mechanismem separace v kapalinové chromatografii. Na základě fyzikálně-chemických vlastností analytu dojde k jeho navázání na sorbent, a po vymytí balastních látek, k jeho desorpci. V současné době je na trhu velké množství specifických sorbentů. Správnou volbou rozpouštědla a sorbentu lze provést přečištění, zkoncentrování a izolaci analytu v jednom kroku. Optimalizace tohoto procesu je náročná a je nutno znát co nejvíce informací jak o analytu, který chceme z matrice extrahovat, tak o látkách, které chceme odstranit[30,35,42].

Modifikací SPE je mikroextrakce na pevné fázi (SPME). Principem SPME je zachycení analytu na povrchu sorbentu, který je nanesen na křemenném vlákně. Z důvodu mechanické ochrany bývá křemenné vlákno uloženo uvnitř duté ocelové jehly. Analytickou koncovkou je nejčastěji plynová chromatografie, pro netěkavé látky kapalinová chromatografie.

Další extrakční metoda, založena na extrakci na tuhé fázi, byla použita na Zheijang Academy of Traditional Chinase Medicine při extrakci flavanoidů z extraktu Škorlice. Pro extrakci bylo využito sorbentu umístěného ve špičce automatické pipety. Takže k separaci analytu docházelo během pipetování rostlinného extraktu. Tato metoda vykázala vysokou výtěžnost, dobrou linearitu a nízké meze stanovitelnosti. Dalšími klady této metody je malá spotřeba vzorku a organických rozpouštědel[43].

2.6.3 Extrakce disperzní tuhou fází (MSPD, Matrix Solid-Phase Dispersion)

Tato metoda je založena na ručním mísení pevných a polopevných vzorků s vhodným sorbentem na tuhé fázi. K mísení vzorku se sorbentem dochází ve třecí misce během homogenizace vzorku. Takto připravená směs je následně převedena na kolonu pro sloupcovou chromatografii a eluována vhodným rozpouštědlem. Klíčovým faktorem ovlivňující tuto extrakční techniku je charakteristika použitého sorbentu, použití chemického modifikátoru a složení elučního činidla[30;44].

2.7 Metody detekce

2.7.1 Spektroskopické stanovení

Molekuly flavanoidů, jakož i dalších látek ze skupiny fenolických sloučeniny, nesou ve své struktuře chromofory. Jedná se o seskupení atomů v molekule, které způsobuje absorpci záření ve viditelné a ultrafialové oblasti, díky čemuž lze tyto látky spektrofotometricky stanovovat[33,45].

Spektrofotometrie je hojně využívaná optická metoda především v kvantitativních stanoveních, které jsou vyhodnocovány nejčastěji pomocí kalibrační křivky. V omezené míře ji lze využít i pro strukturální analýzu, kde je hlavním omezením šířka absorpčních pásů a fakt, že mnoho látek absorbuje při stejných vlnových délkách.

Množství pohlceného záření je matematicky popsáno Lambert-Beerovým zákonem:

$$A=\mathcal{E}\cdot c\cdot l$$

Kde množství pohlceného záření, absorbance A, závisí na celkovém počtu částic, s kterými svazek paprsků interaguje a na molárním absorpčním koeficientu $\mathcal{E}$. Množství interagujících částic je přímo závislé na koncentraci analyzované látky c a tloušťce absorpčního prostředí l. Molární absorpční koeficient je naopak závislí na průřezu absorbující částice a vlnové délce záření.

Uspořádání spektrofotometru:

Spektrofotometr je zařízení, které je schopno snímat absorpční křivku v závislosti na vlnové délce záření. Spektrofotometry mají čtyři základní části a to: emisní, disperzní, absorpční a vyhodnocovací.

Emisní částí se rozumí zdroj záření spojitého spektra v širokém rozsahu vlnových dálek s dostatečnou intenzitou. Jako zdroj záření pro viditelnou oblast se nejčastěji využívá wolframových, nebo také halogenových žárovek, které poskytují spojité spektrum s dostatečnou intenzitou a jejich pořizovací cena je velice nízká. Pro měření v ultrafialové oblasti se hojně využívá vodíkových, či deuteriových výbojek. Existují i zdroje záření, které lze využít jak pro měření ve viditelné oblasti spektra, tak i pro ultrafialovou oblast. Takovým zdrojem je například xenonová výbojka, která má však mnoho nevýhod. Největší nevýhodou

je, že mimo spojité spektrum vyzařuje i spektrum čárové a tím dochází k velkým rozdílům v intenzitě jednotlivých vlnových délek. Intenzita záření není příliš stabilní a pořizovací cena je vysoká.

Disperzní část je tvořena monochromátorem, který má za úkol rozdělit polychromatické světlo na jednotlivé paprsky o konkrétní vlnové délce. Historicky se k tomuto účelu využívali barevné filtry, nebo skleněné hranoly. V dnešní době se nejčastěji využívají optických mřížek. Důležitým prvkem disperzního části je štěrbina, jejíž nastavení ovlivňuje rozsah vlnových délek vycházejících z monochromátoru. Širší štěrbina propouští více světla a umožňuje citlivější měření, zároveň propouští i širší rozsah vlnových délek, což ovlivňuje specifičnost stanovení.

Absorpční část je prostorem pro umístění vzorku. Vzorky jsou nejčastěji měřeny v kyvetách o přesných rozměrech. Materiál kyvety je vybrán tak, aby neabsorboval v rozsahu vlnových délek, při nichž bude měření probíhat.

Vyhodnocovací částí je detektor, který je tvořen fotoelektrickým prvkem. Intenzita je vyhodnocena za pomocí systému převodníků porovnáním intenzity dopadajícího světla procházejícího měřeným vzorkem a slepým vzorkem.

HPLC detektory:

Spektrofotometrické detektory jsou díky své ceně a univerzálnosti snad nejrozšířenějšími detektory pro spojení s kapalinovou chromatografií. V průběhu let se vyvíjeli jak jednotlivé typy detektorů, tak jejich konstrukce. Nejjednodušším typem detektoru je detektor s fixní vlnovou délkou, nejčastěji 253,7 nm, který jako zdroj záření využívá nízkotlakou rtuťovou výbojku. Dále existují detektory schopné měřit několik vlnových délek najednou, popřípadě detektory s proměnnou vlnovou délkou, kterou nelze měnit během měření. Technicky nejpropracovanější jsou detektory diodového pole, které umožňují snímat celé spektrum v reálném čase. Polychromatický paprsek ze světelného zdroje prochází vzorkem a následně je rozkládán na holografické mřížce. Jednotlivé paprsky monochromatického světla dopadají na diodové pole, které se skládá z určitého množství fotodiod. Každá fotodioda je spojena s kondenzátorem, předem nabitým na určitou hodnotu. Při dopadu záření na diodu dojde k vybití kondenzátoru. Proud potřebný k dobití

kondenzátoru na původní hladinu je úměrný intenzitě dopadajícího záření. Tyto detektory jsou tedy schopny zaznamenat spektrum látky při jakékoli vlnové délce[45].

Nepřímé spektrofotometrické metody:

Nepřímé spektrofotometrické stanovení flavanoidů je spíše okrajovou záležitostí. Stanovení spočívá v reakci analytu s činidlem, či modifikací analytu, tak aby byl snáze stanovitelný pomocí spektrofotometrie. Jako příklad lze uvést stanovení celkových polyfenolů reakcí s Fe^{3+} kdy jde o reakci fenolových látek, které tvoří barevné komplexy s citranem železito-amonným a ty se následně měří. Toto stanovení se využívá například při analýze chmele, mladiny či piva. Dále lze uvést stanovení katechinů s *p*-dimethylaminocinnamaldehydem, kdy vzniká zeleně zbarvený produkt, jež se následně měří při 640 nm. Jiné typy flavanoidů s *p*-DMCA nereagují. Červeně zbarvený produkt dává reakce vanilinu s katechiny a dihydrochalkany. Proanthokyanidy přechází na barevné anthokyanidy v horké směsy Bu-OH s koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou (95+5)[46].

2.7.2 Fluorescenční spektrometrie

Fluorescenční spektrometrie je optická metoda velice příbuzná spektrofotometrii, ovšem s tím rozdílem, že na místo pohlceného záření molekulou analytu, měříme intenzitu záření analytem emitovanou, takzvanou fluorescenci. Molekula analyzované látky se po absorbování elektromagnetického záření o vhodné vlnové délce dostává do excitovaného stavu. Taková molekula se zbavuje přebytečné energie nezářivými, nebo zářivými procesy. Nezářivé procesy jsou například vibrační relaxace nebo přenos energie do okolí. Pro fluorescenční spektrometrii je důležitý zářiví deexcitační proces, kdy se molekula zbavuje přebytečné energie vyzářením světelného kvanta, jehož intenzita je následně měřena. Díky částečné ztrátě energie nezářivými procesy je vlnová délka emitovaného zářeni vyšší, než vlnová délka absorbovaného záření[33].

HPLC detektory:

Fluorescenční detektor pro HPLC se liší od spektrofotometrických detektorů uspořádáním jednotlivých prvků. Hlavním rozdílem je umístění detekčního prvku kolmo na

paprsek excitačního záření a monochromátoru před tento detekční prvek. Tyto konstrukční změny zamezují zkreslení výsledného měření excitačním paprskem.

Fluorescenční detektory umožňují analýzu pouze těch látek, které jsou schopny fluorescence nebo které byli za tímto účelem modifikované. Což zvyšuje selektivitu a citlivost stanovení na úkor univerzálnosti detektoru.

Optimalizace podmínek pro stanovení vybraných flavanoidů v rostlinném materiálu fluorescenčním detektorem bez nutnosti derivatizace, byla studována na Hangzhou Normal University v Číně. Jako zdroj excitačního záření zde byla použita LED dioda o vlnové délce 480 nm. Limit detekce pro sedm vybraných flavanoidů byl v rozmezí od $3{,}30 \cdot 10^{-8}$ po $2{,}15 \cdot 10^{-6}$ $mol \cdot L^{-1}$.[47]

2.7.3 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je univerzální a velice citlivá fyzikálně chemická instrumentální metoda určená k měření hmotnosti atomů, molekul a jejich fragmentů po převedení na iontovou formu. Přesto že je princip této techniky znám již více než sto let, k největšímu rozvoji došlo v uplynulých několika desetiletích, během nichž získala velikou popularitu a rozšířila se do mnoha vědních oborů.

Základním principem je separace nabitých částic, vznikajících v iontovém zdroji, magnetickým a elektrickým polem analyzátoru na základě jejich poměru hmoty ku náboji (m/z). Dalo by se teda také říci, že se jedná i o metodu separační. Hlavní výhodu je možnost analyzovat vzorky všech skupenství při malé spotřebě analytu. Dalším faktorem, který přispěl k veliké popularitě a rozšíření hmotnostní spektrometrie, je možnost on-line spojení se separačními technikami.

Hmotnostní spektrometr se skládá ze tří základních částí a to z iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru. Vzhledem k rozmanitosti použití hmotnostní spektrometrie se jednotlivé části dočkaly mnohých modifikací a vylepšení, což konečnému uživateli do jisté míry umožňuje najít si optimální technické řešení pro jeho analýzy.

Iontových zdrojů existuje několik typů a při výběru iontového zdroje bychom měli zohlednit především skupenství analytu a jeho fyzikálně-chemické vlastnosti. Úkolem

iontového zdroje je převést analyt do plynného skupenství a ionizovat jej. Nabité části jsou pak fokusovány iontovou optikou do analyzátoru.

Hmotnostní analyzátor je část hmotnostního spektrometru, která je zodpovědná za separaci iontů. Děje se tak ve vakuu působením magnetického, či elektrického pole. Trajektorie pohybujících se iontů je ovlivňována tak, aby k detektoru dorazily pouze ionty o určitém poměru m/z. Technická řešení jsou rozmanitá. Liší především uspořádáním, rozlišením a cenou.

Detektor zaznamenává ionty vybrané analyzátorem a měří elektrický signál, který vzniká při dopadu iontu na dynodu detektoru. Signál je následně zesilován za pomocí elektronového násobiče. Zvláštní typem detektoru jsou detektory, které zaznamenávají komplexní proudový odraz všech iontů rotujících v cele detektoru a za pomocí Fourierovy transformace vypočtou koncentraci a hmotnost jednotlivých iontů[44].

2.7.4 Elektrochemické metody

Elektrochemické analytické metody jsou velice citlivé a selektivní, jsou ekonomicky nenáročné, avšak jejich provedení a interpretace výsledků si často žádá zkušenějšího uživatele. Nejčastějším uspořádáním je dvou, či tříelektrodové zapojení ve vsádkovém, nebo průtočném systému. Analytem pro elektrochemická stanovení je látka schopna elektrochemické reakce, výměny elektronů, na povrchu elektrody. Nejčastěji jde o elektrochemickou oxidaci, či redukci. Díky antioxidačním vlastnostem lze flavanoidy lehce stanovovat za pomocí elektrochemických metod[46,48].

Voltametrie

Voltametrie nebo také volt-ampérometrie je principiálně založena na měření proudové odezvy v závislosti na vkládaném, lineárně se měnícím, potenciálu. Jako materiál pro pracovní elektrodu se nejčastěji slouží platina, rtuť, zlato, uhlík, nebo jeho modifikace. Voltametrie je díky šíři svého využití jednou z nejrozšířenějších elektrochemických metod. Lze ji využít jak k rutinnímu stanovení organických i anorganických látek, tak i k základnímu výzkumu. Podrobnou interpretací naměřených dat je možno zjistit počet vyměněných elektronů mezi analytem a elektrodou, reverzibilitu elektrodové reakce, stabilitu

meziproduktů, podrobný mechanismus reakčního děje, identifikovat elektrochemicky generované radikálové částice, připravovat a charakterizovat nové sloučeniny. Dále lze také studovat rozmístění elektronů v molekule, jejich delokalizaci, intramolekulové elektronové interakce, nebo kvantifikovat vliv substituce a geometrii molekuly na její chemické vlastnosti.

HPLC detektory:

Voltametrické detektory měří proud vyvolaný průchodem oxidované nebo redukované látky měrnou celou detektoru. Elektrické zapojení a uspořádání elektrod je u většiny detektorů stejný, detektory se mohou lišit geometrií detekční cely. Jako materiálu pro pracovní elektrodu se nejčastěji využívá skelného uhlíku, grafitového vlákna, zlata, platiny, mědi nebo jiného kovu. Srovnávací elektrodou je nejčastěji argentochloridová, či kalomelová elektroda. Jak pracovní, tak srovnávací elektrodu lze snadno miniaturizovat, díky čemuž lze tyto detektory snadno použít i v chromatografických systémech s velice malými průtoky mobilní fáze. Nevýhodou voltametrického detektoru je pasivace plochy elektrod produkty elektrochemické reakce, což způsobuje snížení odezvy na analyt v průběhu času. Z tohoto důvodu je nutno elektrody čistit. V dnešních detektorech probíhá čištění například vložením střídavého proudu, nebo obrácením polarit elektrodového systému, díky čemuž dojde k rozpuštění povlaku na pracovní elektrodě. Další nevýhodou, s kterou je nutno počítat je průběh elektrodové reakce pouze v tenké vrstvě okolo plochy elektrody, odezva detektoru je tak ovlivňována rychlostí průtoku mobilní fáze[43,48].

Coulometrie

Coulometrie je velice citlivá elektrochemická metoda založena na měření náboje potřebného k úplné přeměně stanovované látky. Je tedy metodou absolutní. Podmínkou správného měřeni je průběh pouze jedné reakce na pracovní elektrodě a to ze sta procent. Jakákoli vedlejší reakce, například elektrolýza rozpouštědla, či reakce látek rozpuštěných ze vzduchu, zkresluje výsledek měření. Rušivý vliv látek, které vznikají na pracovní elektrodě, se odstraní oddělím prostoru pracovní elektrody od prostoru zbylých elektrod přepážkou, diafragmou, která omezuje vzájemnou difuzi elektrolytu mezi oběma poločlánky. Coulometrická analýza se může uskutečnit za konstantního potenciálu pracovní elektrody (potenciostatická coulometrie), nebo za konstantního proudu (coulometrická titrace).

Potenciostatická coulometrie má nastavenou konstantní hodnotu potenciálu na pracovní elektrodě a měřený proud díky postupnému úbytku analytu klesá až téměř k nule. Náboj potřebný k úplné reakci se vypočte integrací křivky závislosti proudu na čase.

Coulometrická titrace má na pracovní elektrodě nastavenou konstantní hodnotu proudu a jsou možné dva způsoby měření. V prvním případě se elektrodové reakce účastní přímo analyzovaná látka, primární titrace. Ve druhém případě je analyt titrován látkou vznikající na pracovní elektrodě, sekundární titrace. Potřebný náboj pro reakci je vypočítán prostým součinem proudu a času[44,48].

HPLC detektory:

Coulometrické detektory využívají potenciostatické coulometrie pro měření náboje potřebného na oxidaci či redukci stanovované látky. Coulometrie je absolutní metodou a pro přesné měření je nezbytné, aby reagovaly všechny molekuly analytu. Toho lze dosáhnou maximalizací plochy pracovní elektrody. Nejčastěji se využívá porézní grafitová elektroda, připomínající fritu v cele detektoru. Výhodu colometrických detektorů je možnost jejich sériového zapojení a nastavení každého z nich na jinou hodnotu potenciálu, díky čemuž lze detekovat několik analytů během jedné separace. Také je možnost detekovat na jedné elektrodě produkty elektrochemické reakce z elektrody předešlé. Mobilní fáze může obsahovat elektroaktivní nečistoty, které by mohli zkreslovat měření. K odstranění těchto látek se používá porézní grafitová elektroda, na kterou je vloženo určité napětí[48].

2.8 Analytické metody pro stanovení flavanoidů

2.8.1 Chromatografie na tenké vrstvě (TLC, Thin-Layer Chromatography)

Analýza flavanoidů za pomocí chromatografie na tenké vrstvě je velice jednoduchá, rychlá a levná. Nízká výtěžnost a omezená možnost kvantifikace dělá z této metody metodu spíše orientační.

Separace látek probíhá nejčastěji na hliníkové destičce pokryté tenkou vrstvou stacionární fáze. Na dolní konec destičky se nanese malé množství vzorku a vloží se do vyvíjecí komory, která obsahuje vhodné rozpouštědlo. Rozpouštědlo vzlítá vrstvou stacionární fáze a společně s ním i jednotlivé látky analytu, které migrují stacionární fází rozličnou rychlostí. Dochází k dělení látek. Výběr stacionární fáze závisí na skupině

stanovovaných flavanoidů. Hydrofilní flavanoidy mohou být snadno separovány na polyamidu, nebo mikrokrystalické celulose. Méně hydrofilní látka jako jsou flavony a isoflavony lze separovat na silikagelu. Látky jsou identifikovány porovnáním retence se standardy. Pro detekci okem neviditelných látek lze využít činidla, která s analytem reagují za vzniku barevných, či fluorescenčních komplexů[49].

V práci Jürgena M. Schultze z Hannoverské univerzity bylo popsáno stanovení a rozlišení vice než dvaceti fenolických kyselin separací na tenké vrstvě a detekcí postřikem $TiCL_4$ nebo $FeCl_3$ a následnou reakcí s alkalickým činidlem diazobenzen sulfonátu[50].

2.8.2 Plynová chromatografie (GC, Gas Chromatography)

Plynová chromatografie je rozšířenou instrumentální metodou zejména pro analýzu těkavých látek. Pro separaci a stanovení flavanoidů se používá od počátku šedesátých let minulého století, především však pro jednoduché fenolové kyseliny a nízkomolekulární flavanoidy, které jsou dostatečně těkavé. Pomocí GC lze analyzovat i méně těkavé flavanoidy, které je nezbytné před analýzou derivatizovat za vzniku těkavějších derivátů. Derivatizace probíhá především na hydroxy, karboxy nebo amino skupině za vzniku trimethylsilyleterových derivátů. V případě flavanoidů jsou nejčastějšími derivatizačními činidly N,O-bis-(trimethylsilyl)acetamid, N-metyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamid a N,O-bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamid. Separace probíhá na kapilární koloně z taveného křemene o délce 25-30 m s vnitřním průměrem 0,25-0,5 mm a tloušťkou stacionární fáze 0,25 μm. Mobilní fází je plyn. Pro detekci analytu byl dříve nejvíce používaný plamenově ionizační detektor (FID), dnes je nejrozšířenější spojení plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS). Přesto že GC metoda poskytuje vysokou rozlišovací schopnost a nízké detekční limity, nutnost derivatizačního kroku z ní dělá metodu náročnou na provedení a čas.

Vysokou citlivost stanovení flavanoidů pomocí plynové chromatografie potvrzuje i práce vědců z centra pro výzkum a vývoj léčivých rostlinných produktů na Univerzitě Khon Kaen. V této práci bylo dosaženo limitu detekce od 0,1 ppm po 1 ppm a limitu stanovitelnosti od 0,5 ppm do 3,0 ppm. Stanovení proběhlo pro jedenáct flavanoidů identifikovanýcha separovaných z rostliny *Keampferia parviflora*, využívané v lidovém léčitelství[49].

2.8.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC – Hight Performance Liquid Chromatography)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je nejvíce rozšířenou instrumentální metodou pro separaci a stanovení flavanoidů. Pro separaci se nejčastěji využívá uspořádání na reverzních fázích se stacionární fází na bázi polymeru, či alkylovaného silikagelu C_{18}, C_8, popřípadě modifikovaným sorbentem fenylovou či diolovou skupinou. Klíčovou roli v separaci a retenci analyzovaných látek hraje složení mobilní fáze, které může být neměnné (izokratická eluce), nebo se může v průběhu analýzy měnit (gradientová eluce). Mobilní fáze je složena z vodného roztoku kyselin (octové, mravenčí, trifluoroctová, fosforečná…), či pufrů a organického rozpouštědla o různé eluční síle (acetonitril, metanol, etanol, n-propanol, tetrahydrofuran…). Kapalinová chromatografie disponuje rozmanitou škálou detektorů, jež lze využít pro stanovení flavanoidů. Jednotlivé typy detektorů a principy, na kterých jsou založeny, popisuje kapitola zabývající se detekcí.

Rozsáhlá práce, popisující profil flavanoidů u 24 druhů fazole, byla publikována americkými vědci z Plant Science Institute a Agricultural Research Servis. K separaci jednotlivých typů flavanoidů byla použita kolona s C_{18} stacionární fází o velikosti částic 5 µm a rozměru 250 x 4,6 mm. Mobilní fáze A (0,1% FA ve vodě), mobilní fáze B (0,1% FA v acetonitrilu). Gradient byl použit lineární, a to: 10-26% B (v/v) 40 min, 65% B 70 min, 100% B 71-75 min. Analyty byly detekovány pomocí DAD detektoru a hmotnostního detektoru s ionizací elektrosprejem. Vědcům se podařilo identifikovat více než čtyřicet flavanoidů a fenolických kyselin a stanovit jejich zastoupení u jednotlivých druhů fazolí[49, 51].

2.8.4 Kapilární elektroforéza (CE – Capilary Electrophoresis)

Kapilární elektroforéza je ve srovnání s plynovou, či kapalinovou chromatografií relativně mladou elektromigrační metodu pro separaci nabitých částic. Látky jsou separovány v krátké křemenné kapiláře na základě svých migračních rychlostí v elektrickém poli. Rychlost pohybu iontů se zvyšuje s hodnotou náboje daného iontu a naopak se klesá s rostoucím hydrodynamickým poloměrem. Tyto vlastnosti závisí na složení, pH a viskozitě elektrolytu, ve kterém se ionty nachází. Dalším faktorem ovlivňujícím rychlost iontu je intenzita stejnosměrného napětí, vkládaném na elektrody umístěné v elektrodových nádobách, které jsou propojeny pracovní kapilárou. Důležitým jevem v kapilární elektroforéze je elektroosmotický tok (EOF - ElektroOsmotic Flow) pracovního elektrolytu směrem ke

katodě, který vzniká disociací –SiOH skupin na povrchu kapiláry, kde dochází ke vzniku elektrické dvojvrstvy. Rychlost elektroosmotického toku je ovlivněna pH elektrolytu. Pokud je pH>2 je rychlost EOF větší než migrace většiny iontů a mi tak můžeme v jedné analýze stanovit kationty i anionty. Neutrální látky migrují pouze rychlostí EOF, nelze je tedy separovat, ale slouží nám jako markery pro určení rychlosti EOF.

Skupina vědeckých pracovníků z *Nacional Univerzity of Singapure* porovnávala metody stanovení čajových katechinů kapalinovou chromatografií a kapilární elektroforézou. Opakovatelnost obou metod byla větší než 90%. Stanovení pomocí kapilární elektroforézy byla oproti HPLC výrazně kratší (10 min/27 min), ale citlivost byla pětkrát nižší. U obou metod byl použit DAD detektor. Nižší citlivost CE metody tak mohla být způsobena malými rozměry detekční cely. Tento handicap je částečně řešen kapilárami, které jsou v místě detekce rozšířené (například tvar bubliny). Optická dráha paprsku detektoru je delší, což zvyšuje citlivost detektoru[51].

3 Experimentální část

Cílem této práce bylo nejprve vybrat vhodnou rostlinu a podmínky pěstování pro náš experiment. Nalezení metody extrakce flavonoidů z rostlinného materiálu. Analýza složení extraktu listů rostlin a identifikace flavonoidů přítomných v extraktu metodou UHPLC-MS/MS. Kvantifikace nalezených flavonoidů v jednotlivých rostlinách a popsání změny profilu flavonoidů v rostlinách v závislosti na různých podmínkách pěstování.

3.1.1 Použité chemikálie

Redestilovaná voda (deionizační stanice Milipore, Molsheim, Francie), methanol (Sigma-Aldrich, HPLC grade, CAS: 67-56-1), acetonitril (Sigma-Aldrich, HPLC grade, CAS: 75-05-8), kyselina mravenčí (Lachema, Brno, ČR p.a., CAS: 64-18-6), kyselina chlorovodíková (Lachema, Brno, ČR p.a., CAS: 7647-01-0), biochanin A (Sigma-Aldrich, CAS: 491-80-5), daidzein (Sigma-Aldrich, čistota >98 %, CAS: 486-66-8), genistein (Sigma-Aldrich, čistota >98 %, CAS: 446-72-0), kaempferol (Sigma-Aldrich, čistota >90 %, CAS: 520-18-3), quercetin (Sigma-Aldrich, CAS: 6151-25-3), rutin (Sigma-Aldrich, CAS: 207671-50-9), $ZnSO_4$ (Sigma-Aldrich, CAS: 7733-02-0), $CuSO_4$ (Sigma-Aldrich, CAS: 7758-98-7), $Cr_2(SO_4)_3$ (CAS: 10101-53-8), $NiSO_4 \cdot 6H_2O$ (Sigma-Aldrich,CAS: 10101-98-0)

3.1.2 Analyzované vzorky

Analyzovanými vzorky byly listy rostlin *Phaseolus vulgarit* L., odrůd Carmen a Blauhilde. Celkem bylo analyzováno 30 vzorků z rostlin vystavených různé zátěži těžkými kovy aplikovanými formou zálivky v průběhu růstu.

3.1.3 Vybrané druhy rostlin

Pro naši studii byly vybrány dvě odrůdy fazolu obecného (*Phaseolus vulgaris* L.). Obě odrůdy jsou běžně pěstovány na území České republiky pro potravinářské účely.

Phaseolus vulgarit L. - Carmen

Carmen je pozdní odrůdou fazole keříčkovitého typu s vegetační dobou 125 – 135 dní. Rostlina dorůstá délky 45 – 50 cm a tvoří 15 – 20 cm dlouhé, mírně prohnuté lusky o průměru 0,8 cm. Odrůda Carmen se pěstuje především na semeno, které je větší velikosti, oválného tvaru a červenohnědé barvy.

Phaseolus vulgarit L. – Blauhilde

Blauhlide je polo-pozdní odrůdou s vegetační dobou 70 dní a dlouhou dobou sklizně. Rostlina dorůstá výšky okolo 180 cm a lusky mohou být až 25 cm dlouhé. U této odrůdy se konzumují lusky, které obsahují světlá semena. Vařením se barva lusků mění z tmavě fialové na zelenou.

3.1.4 Podmínky pěstování

Semena byla vybrána tak, aby neměla viditelné vady a jejich velikost byla přibližně stejná. Klíčení semen proběhlo na vatě vlhčené vodou po dobu pěti dnů. Pro sadbu byla vybrána semena se silným klíčkem o délce cca 1,5 cm. Naklíčená semena byla opatrně zasazena do květináčů o objemu 2,5 l, obsahujících přibližně 2 kg zahradnického substrátu určeného pro pěstování zeleniny a do hloubky cca 5 cm. Květináče byly umístěny na slunné až polo-stinné místo se vzájemným rozestupem 50 cm.

3.1.5 Výběr těžkých kovů a koncentrace použitých roztoků

Těžké kovy, jejichž vliv na rostliny byl zkoumán v této práci, byly vybrány na základě jejich nadlimitního výskytu v půdách města Olomouc a jejího okolí[52]. Koncentrace jednotlivých roztoků kovů pak byly stanoveny tak, aby během 14-ti dnů pravidelné zálivky v použitém substrátu bylo dosaženo takové koncentrace kovu, která přibližně odpovídá

znečištění půd v okolí Olomouce. Pro porovnání byly dále připraveny roztoky odpovídající hygienickému limitu, koncentrace daného těžkého kovu v půdách, uvedeného v Tab. I, přílohy č.1, Vyhlášky Ministerstva životní prostředí číslo 13/1994 Sb.. Vedle toho byly připraveny i roztoky odpovídající trojnásobku a desetinásobku hygienického limitu pro daný těžký kov. Experiment také obsahoval kontrolní rostliny zalévané pouze vodou.

Tab. I Koncentrace těžkých kovů v suché půdě ($mg \cdot kg^{-1}$)

	Znečištění Olomouce	**Hygienický limit**	**Hygienický limit x 3**	**Hygienický limit x 10**
Zn ($mg \cdot kg^{-1}$)	200,65	100	300	1000
Ni ($mg \cdot kg^{-1}$)	42,22	25	75	250
Cu ($mg \cdot kg^{-1}$)	47,6	50	150	500
Cr ($mg \cdot kg^{-1}$)	92,12	40	120	400

3.1.6 Klimatické podmínky

Rostliny byly pěstovány v období od května do září roku 2014 v obci Bohuňovice (Olomoucký kraj, okres Olomouc) s nadmořskou výškou 226 m a zeměpisnými souřadnicemi: 49°39´41,19´´S a 17°16´43,28´´V. Průměrné roční teploty 7,45°C a průměrné roční srážky 732 mm. Průměrné měsíční hodnoty pro daný rok a dlouhodobý normál jsou uvedeny v Tab. II.

Tab. II Porovnání teplot a průměrných srážek z roku 2014 s dlouhodobým průměrem pro danou oblast

	Květen	**Červen**	**Červenec**	**Srpen**	**Září**
Teploty 2014 (°C)	13,9	17,1	20,9	17,1	15,4
Teploty průměr (°C)	12,5	15,5	16,9	16,5	13
Srážky 2014 (mm)	96	53	82	102	94
Srážky průměr (mm)	80	94	90	84	55

3.1.7 Odběr a zpracování vzorku

Z každé rostliny bylo odstřiženo 5 zelených listů přibližně stejné velikosti, které byly sušeny v laboratorní sušárně do konstantní hmotnosti. Teplota sušení byla 105°C. Následně byly jednotlivé vzorky homogenizovány za pomocí tloučku a třecí misky do konzistence

jemného prášku a uskladněny ve skleněné lahvičce opatřené polypropilonovým víčkem. Vzorky byly skladovány v lednici při teplotě 5°C.

3.1.8 Extrakce

Do skleněné lahvičky o objemu 5 ml bylo na analytických vahách naváženo přibližně 125 mg vzorku. Každý vzorek byl navážen ve dvou opakováních. Následně bylo přidáno 2,5 ml extrakčního činidla o složení metanol/voda (60:40, v/v) a vzorek byl sonifikován po dobu 60 min, přičemž teplota během sonifikace nepřekročila 40°C. Vzorek byl odstředěn při 6000 RPM/min po dobu 15 minut. Bylo dpipetováno 2 ml supernatantu a odpařeno pod proudem dusíku. Odparek byl důkladně rozpuštěn v 1 ml extrakčního činidla. Do vialky bylo odpipetováno 0,5 ml extraktu, k extraktu bylo přidáno 0,5 ml extrakčníhočinidla, vialka byla vložena do autosampleru a vzorek byl analyzován UHPLC-MS. Zbylý extrakt byl použit pro kyselou a bazickou hydrolýzu[53].

Kyselá hydrolýza

K roztoku extraktu o objemu 0,5 ml z první navážky bylo přidáno 0,1 ml koncentrované HCl (12 $mol \cdot l^{-1}$). Směs byla důkladně promíchána a zahřívána na teplotu 85°C po dobu 2 hodin v sušárně. Po vychlazení na laboratorní teplotu bylo přidáno 0,4 ml metanolu a směs byla 10 minut sonifikována. Následně byl vzorek odstředěn při 6000 RPM/min, odpipetován do vialky a proměřen metodou UHPLC-MS[53].

Bazická hydrolýza

Odparek z druhé navážky byl rozpuštěn v 0,6 ml (4 $mol \cdot l^{-1}$) NaOH a ponechán reagovat po dobu 24 hodin při laboratorní teplotě v atmosféře dusíku. Následně bylo přidáno 0,3 ml koncentrované HCl (12 $mol \cdot l^{-1}$) a roztok byl promíchán. K roztoku bylo přidáno 1,1 ml metanolu a roztok byl opět promíchán. Nakonec byl odpipetován 1 ml roztoku do vialkya vzorek byl proměřen metodou UHPLC-MS[53].

3.1.9 Metoda stanovení

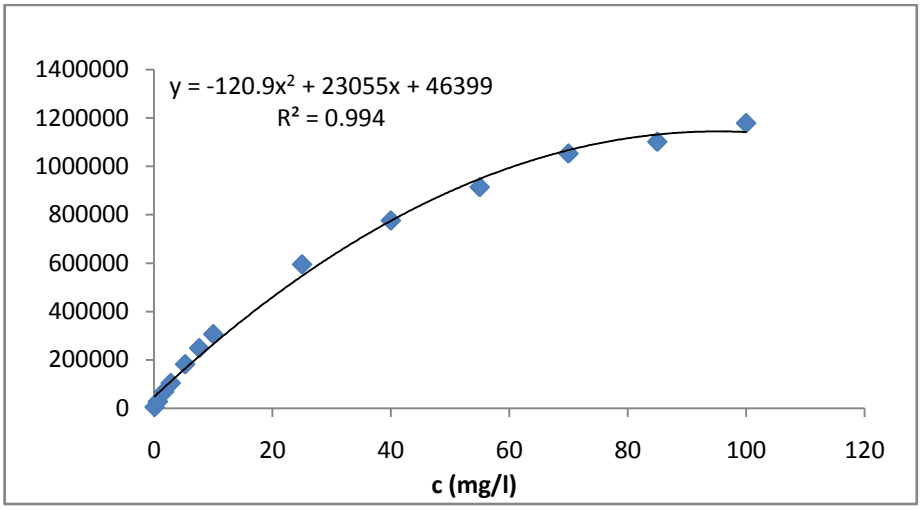
Vzorky byly analyzovány s využitím chromatografického systému Acquity UPLC H-Class (Waters, Milfold USA)ve spojení s tandemovým hmotnostním detektorem Q-TOF Premier (Waters, Milford, USA) vybaveným elektrosprejem (Z-spray) a hybridním analyzátorem QqTOF. Rozsah měřených hmot byl 50 – 1000 Da. Každý vzorek byl proměřen

v pozitivním i negativním módu. Objem dávkovaného vzorku byl 5 µl. Pro separaci byla použita kolona Acquity UPLC BEH Phenyl o rozměrech 2,1 x 100 mm a průměru částic stacionární fáze 1,7 mm. Bylo využito gradientové eluce s mobilními fázemi A (0,1% mravenčí kyselina (FA) v H_2O) a B (0,1% FA v ACN), průtok mobilních fází byl 0,25 ml/min. Profil gradientové eluce: 0-2 min 10-20 % B; 2-12 min 20-95 % B; 12-13 min 95 % B; 13,5-15 min 10 % B. Zpracování naměřených dat bylo provedeno za pomocí softwaru MassLynx V4.1.

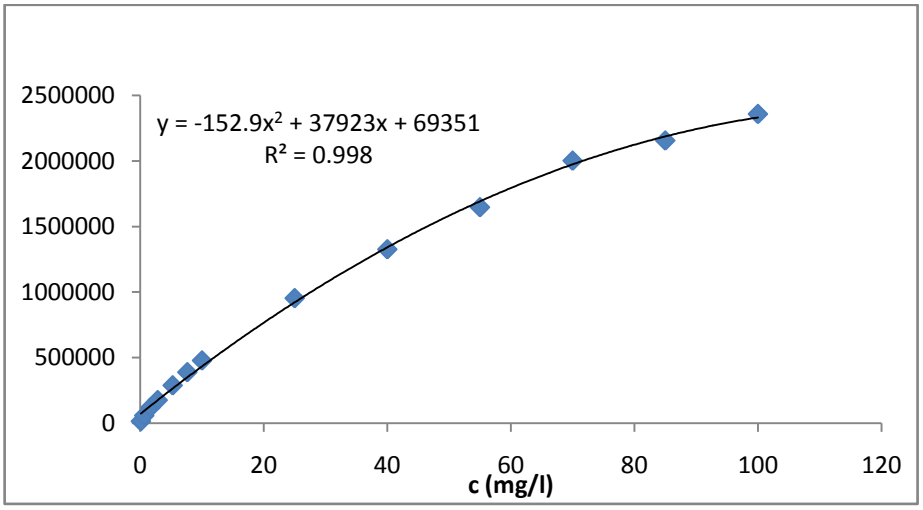
3.1.10 Stanovení identifikovaných flavonoidů

Kvantifikace byla provedena metodou kalibrační křivky. Pro kvantifikaci byly použity tyto látky: biochanin A, daidzein, genistein, kaempferol, quercetin a rutin. Jednotlivé standardy byly rozpuštěny ve směsi metanol:voda (60:40; v/v) na koncentraci 1 $mg \cdot ml^{-1}$ a následně smíchány tak, že výsledná koncentrace každé látky v zásobním roztoku byla 100 $mg \cdot l^{-1}$. Kalibrační body byly připraveny postupným ředěním tohoto roztoku na koncentraci 0,1; 0,5; 1,68; 2,82; 5,25; 7,62; 10; 25; 40; 55; 70; 85. Kalibrační závislost byla vyhodnocena v rozmezí 0,1 – 100 $mg.l^{-1}$. Měření bylo prováděno s využitím chromatografického systému Acquity UPLC I-Class (Waters) s tandemovým hmotnostním detektorem Xevo TQD (Waters) s ionizací elektrosprejem, v pozitivním módu. Chromatografické podmínky byly stejné, jako v případě identifikačních experimentů (viz výše). Separace proběhla na koloně Acquity UPLC BEH Phenyl o rozměrech 2,1 x 100 mm, s průtokem mobilní fáze 0,25 ml/min. Bylo využito gradientové eluce, mobilní fází A (0,1% FA v H_2O) a mobilní fází B (0,1% FA v ACN), s profilem gradientu: 0 min 10% B; 2 min 20% B; 12-13 mi 95% B; 13,5-15 min 10% B. Objem dávkovaného vzorku byl vždy 5 µl. Každý bod kalibrační křivky byl proměřen ve třech opakováních a pro konstrukci kalibrační závislosti byl použit průměr ploch píků a kvadratická regrese. Kalibrační závislosti uvádějí obrázky 1-7.

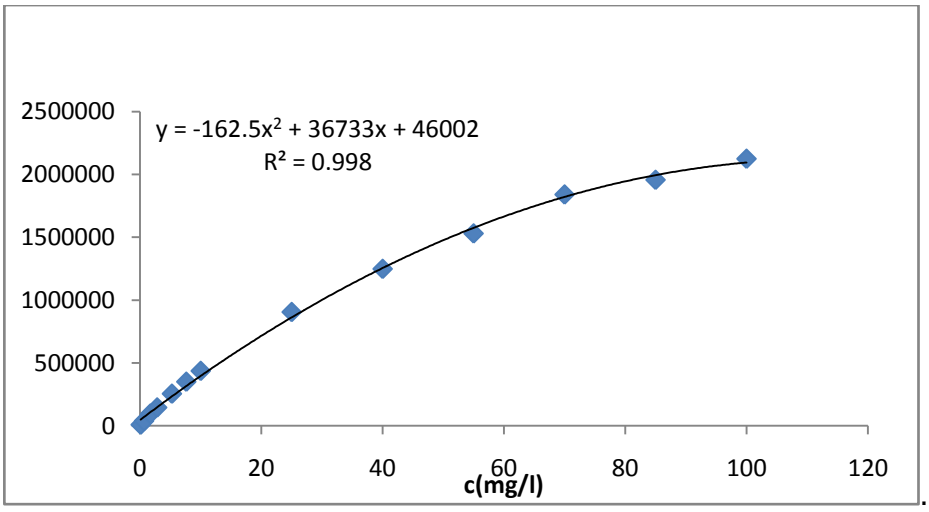
Jednotlivé flavonoidy a jejich glykosylované formy byly kalibrovány na standard příslušného flavonoidu v kalibračním roztoku. Výjimku tvoří formononetin, jehož standard jsme neměli k dispozici. Na základě strukturní podobnosti byl kalibrován na biochanin A. Quercetinmethylpentosylhexosy je substitučním izomerem rutinu, kalibrace tedy proběhla na rutin.



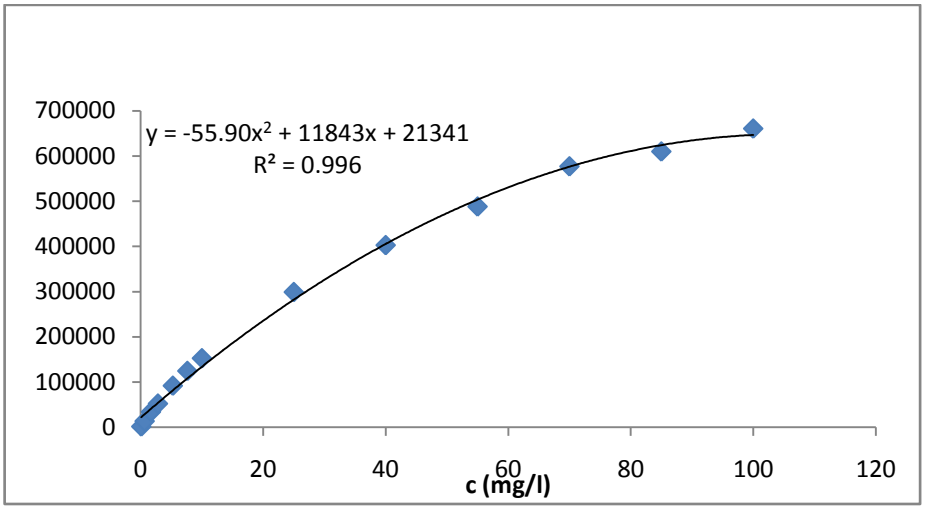
Obr. 1 Graf kalibrační křivky pro biochanin A



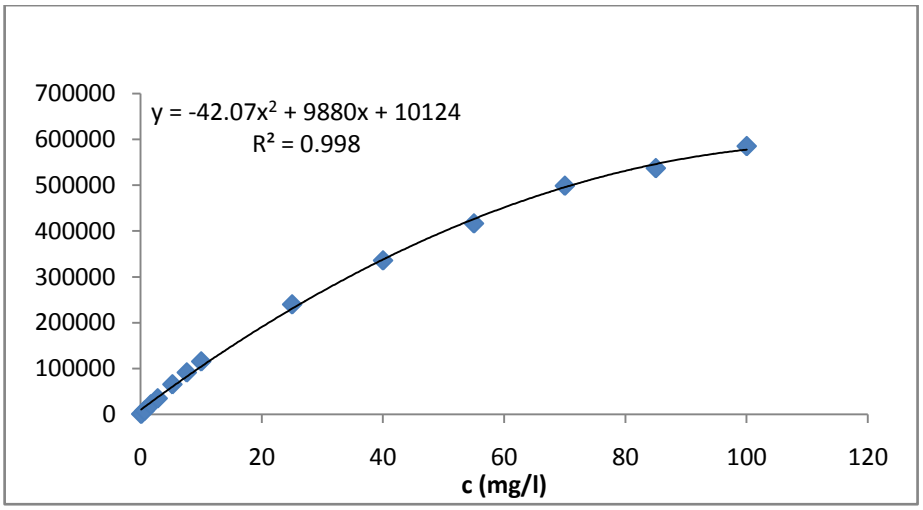
Obr. 2 Kalibrační křivka pro daidzein



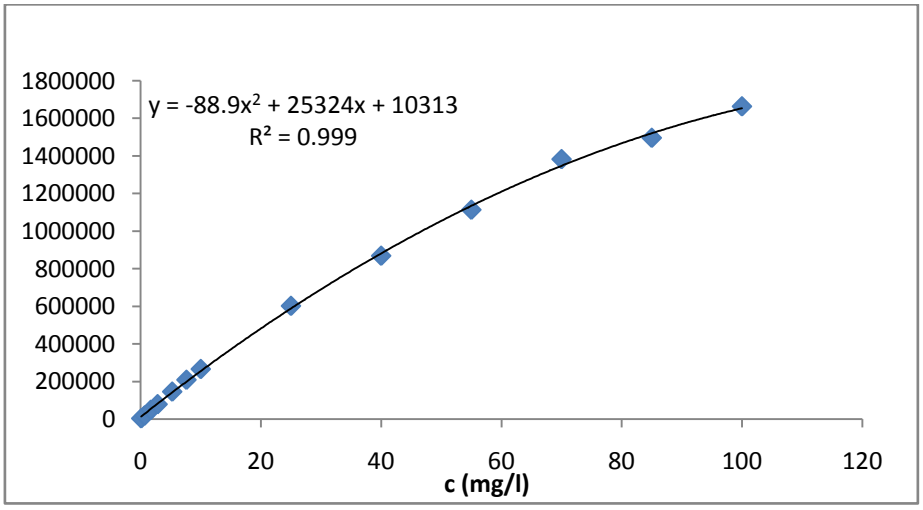
Obr. 3 Graf kalibrační křivky pro genistein



Obr. 4 Graf kalibrační křivky pro kaempferol



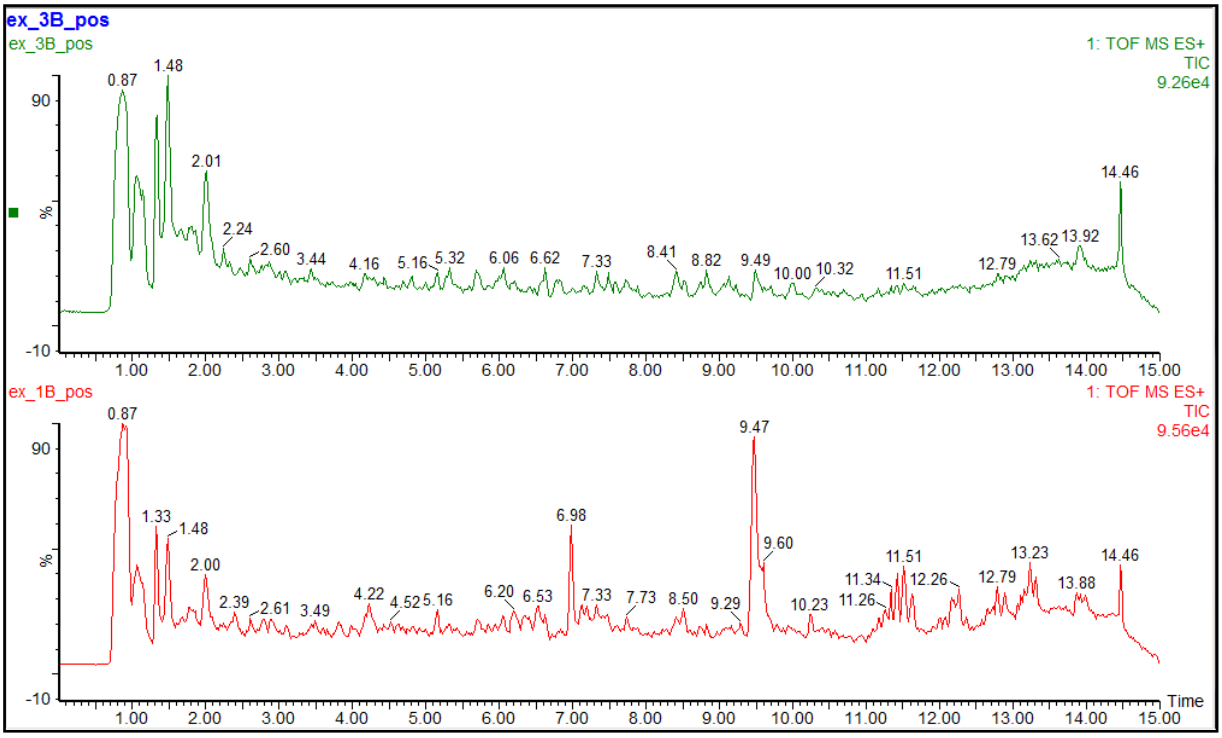
Obr. 5 Graf kalibrační křivky proquercetin



Obr. 6 Graf kalibrační křivky pro rutin

4 Výsledky a diskuze

Byla provedena analýza složení extraktů listů, námi vypěstovaných rostlin rodu fazol obecný (*Phaseolus vulgaris L.*), odrůd Carmen a Blauhilde. Rostlinné materiály a jejich extrakty jsou velice složitou matricí, což lze vidět z **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**., kde jsou porovnány TIC chromatogramy extraktů listů obou odrůd. Pro ilustraci byly použity vzorky z rostlin, které nebyly v průběhu svého růstu zatěžovány těžkými kovy. V těchto vzorcích se nám podařilo identifikovat charakteristické flavanoidy pro jednotlivé odrůdy. Odezva rostlin na zvyšující se koncentraci těžkých kovů v půdě, byla sledována na základě změny obsahu flavanoidů v jednotlivých vzorcích.



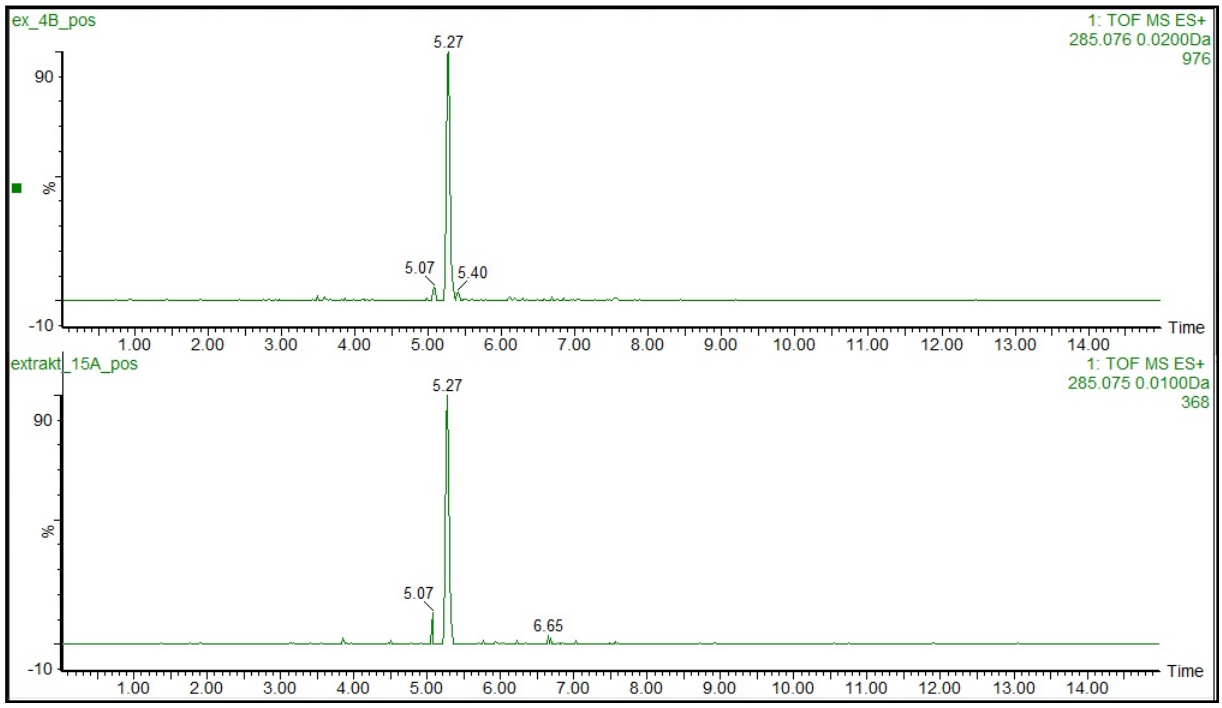
Obr. 7 Porovnání TIC chromatogramů vzorků odrůdy Carmen (nahoře) a Blauhilde (dole) u rostlin zlévaných pouze vodou; (KE 5 eV)

4.1 Identifikované flavanoidy

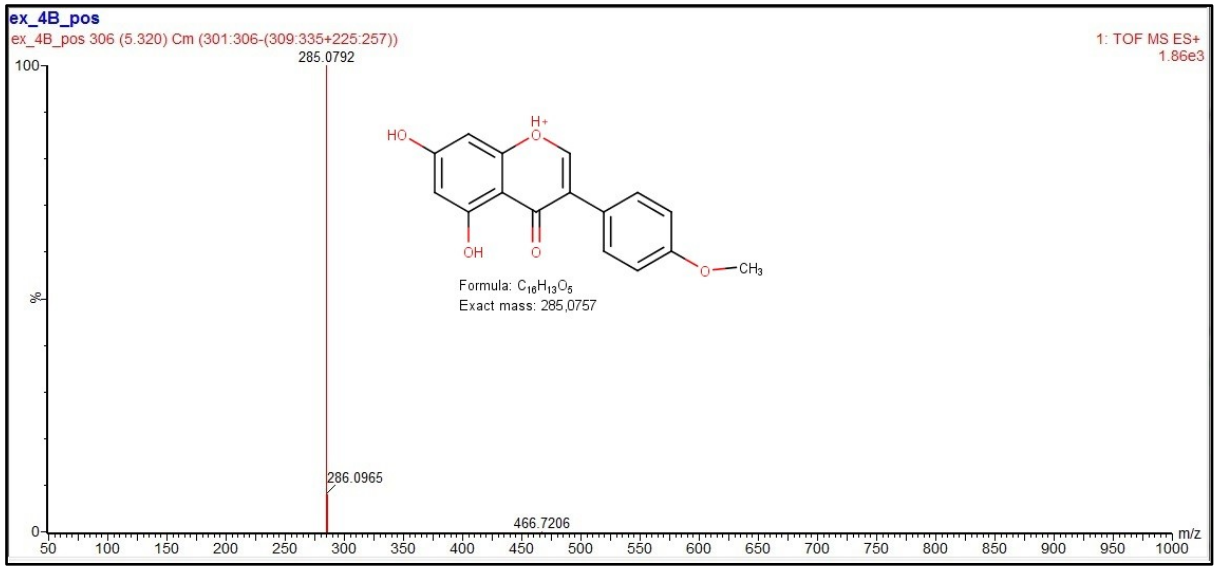
4.1.1 Biochanin A

Biochanin A patří mezi flavanoidy, které jsou společné obou, námi zkoumaným odrůdám. Tato skutečnost byla prokázána shodností retenčních časů v rekonstruovaných chromatogramech pro vypočítanou hmotnost biochaninu A, viz Obr. 8. Identifikace byla

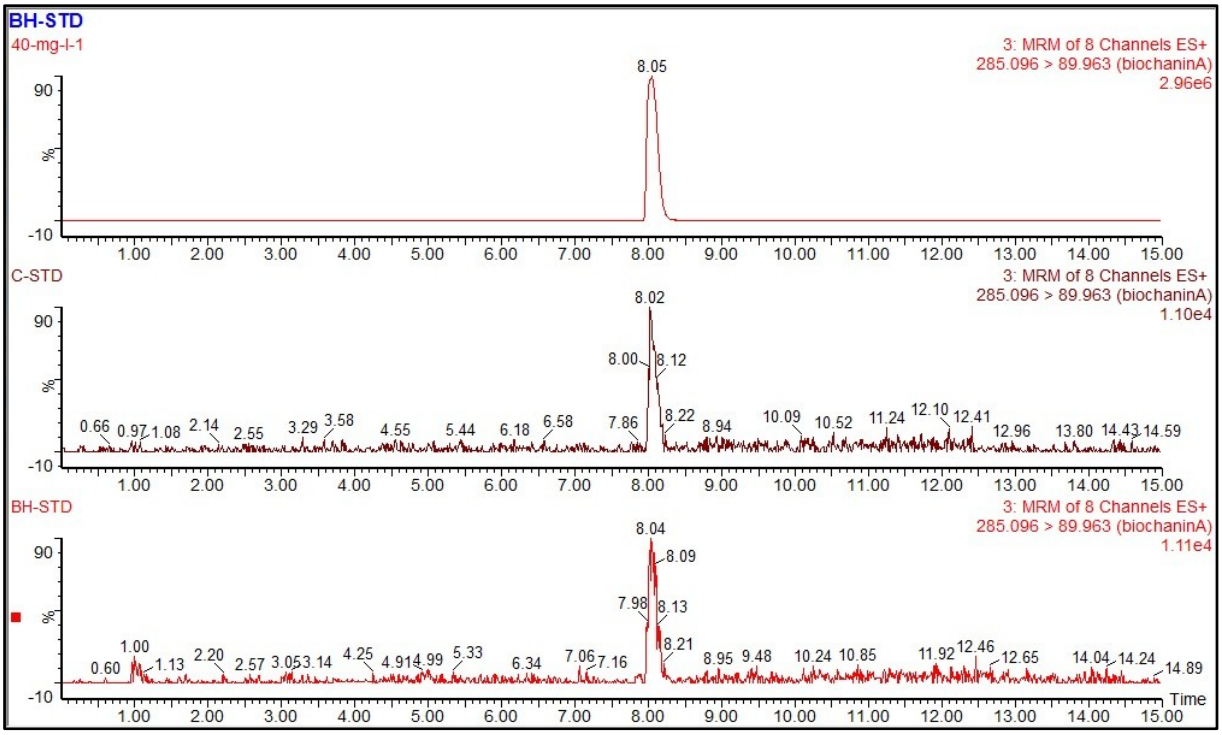
provedena na základě měření správných a přesných hmotností a interpretací MS spekter, Obr. 9. Dále pak porovnáním retenčních časů a MRM přechodů se standardem obsaženým v kalibračním roztoku (Obr. 10).



Obr. 8 Porovnání retenčních časů v rekonstruovaných chromatogramech pro teoretickou hmotnost biochaninu A v extraktech z listů. Odrůda Carmen nahoře, odrůda Blauhilde dole; (KE 5eV)



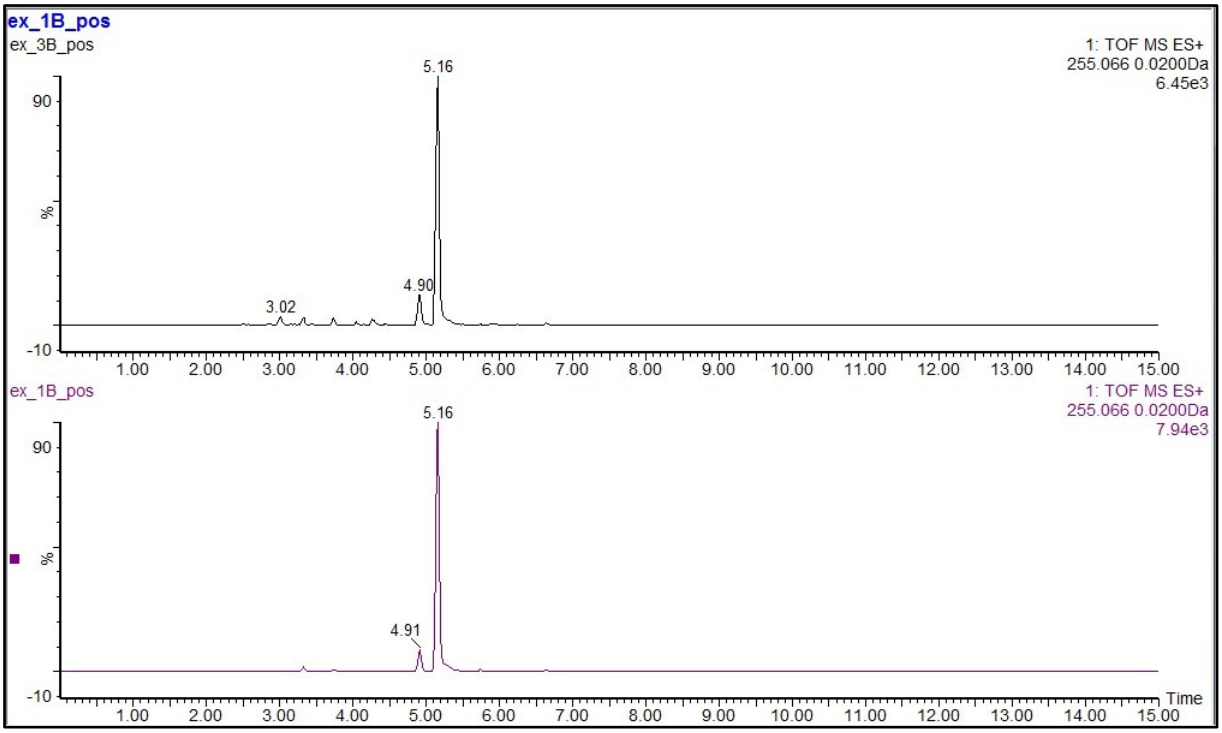
Obr. 9 MS spektrum píku s Rt: 5,27 min chromatogramu odrůdy Carmen a struktura biochaninu A s vypočtenou hmotností; (KE 5eV)



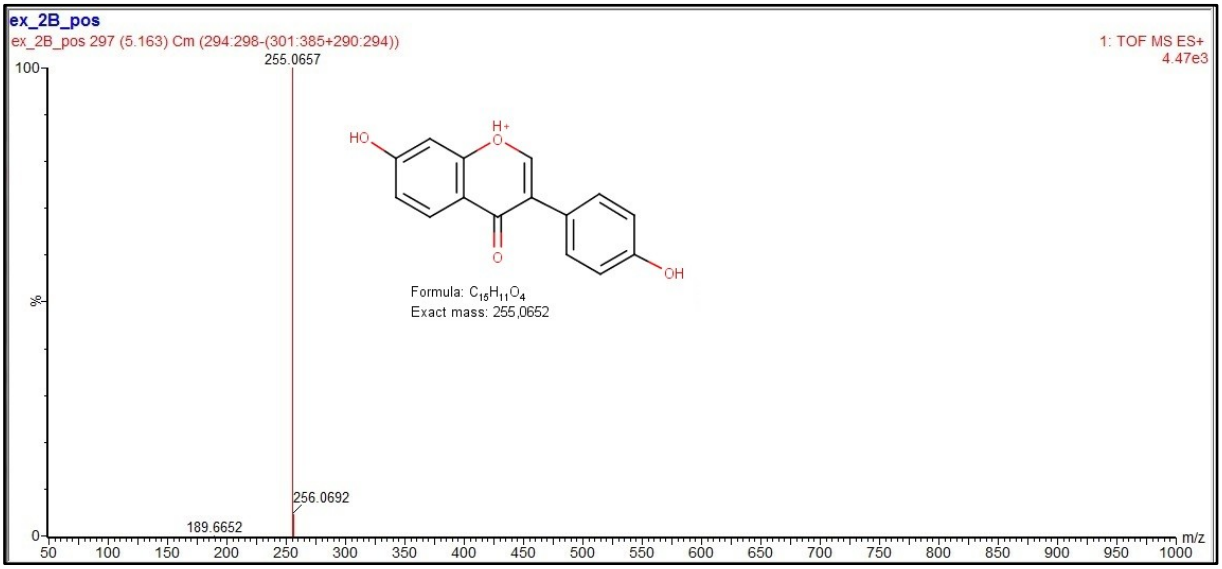
Obr. 10 Porovnání MRM přechodů a jejich retenčních časů pro biochaninu A. Kalibrační roztok s koncentrací 40 $mg \cdot l^{-1}$ nahoře, extrakt kontrolního vzorku odrůdy Carmen uprostřed a extrakt kontrolního vzorku odrůdy Blauhilde dole; (KE 30eV)

4.1.2 Daidzein

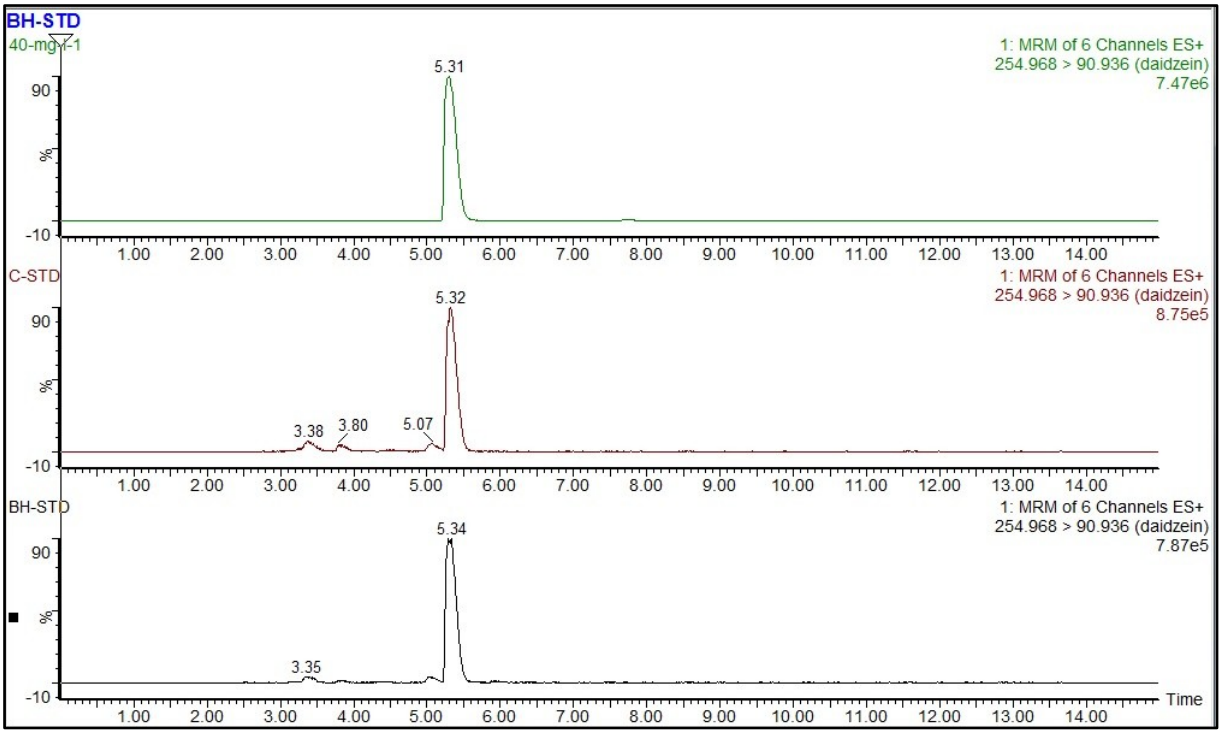
Daidzein je flavanoidem, který byl také identifikován v obou námi zkoumaných odrůdách fazolu. Rekonstruované chromatogramy, pro vypočtenou hmotnost daidzeinu, na Obr. 11 ukazují shodu retenčních časů. K porovnání byly vybrány vzorky bez zatížení těžkými kovy v průběhu růstu. Daidzein byl identifikován na základě interpretace MS spektra píku s retenčním časem 5,16 min, viz Obr. 12. Pro definitivní potvrzení bylo dále využito shody MRM přechodů se standardem daidzeinu z kalibračního roztoku, Obr. 13.



Obr. 11 Porovnání retenčních časů v rekonstruovaných chromatogramech pro teoretickou hmotnost daidzeinu v extraktech z listů. Odrůda Carmen nahoře, odrůda Blauhilde dole; (KE 5eV)



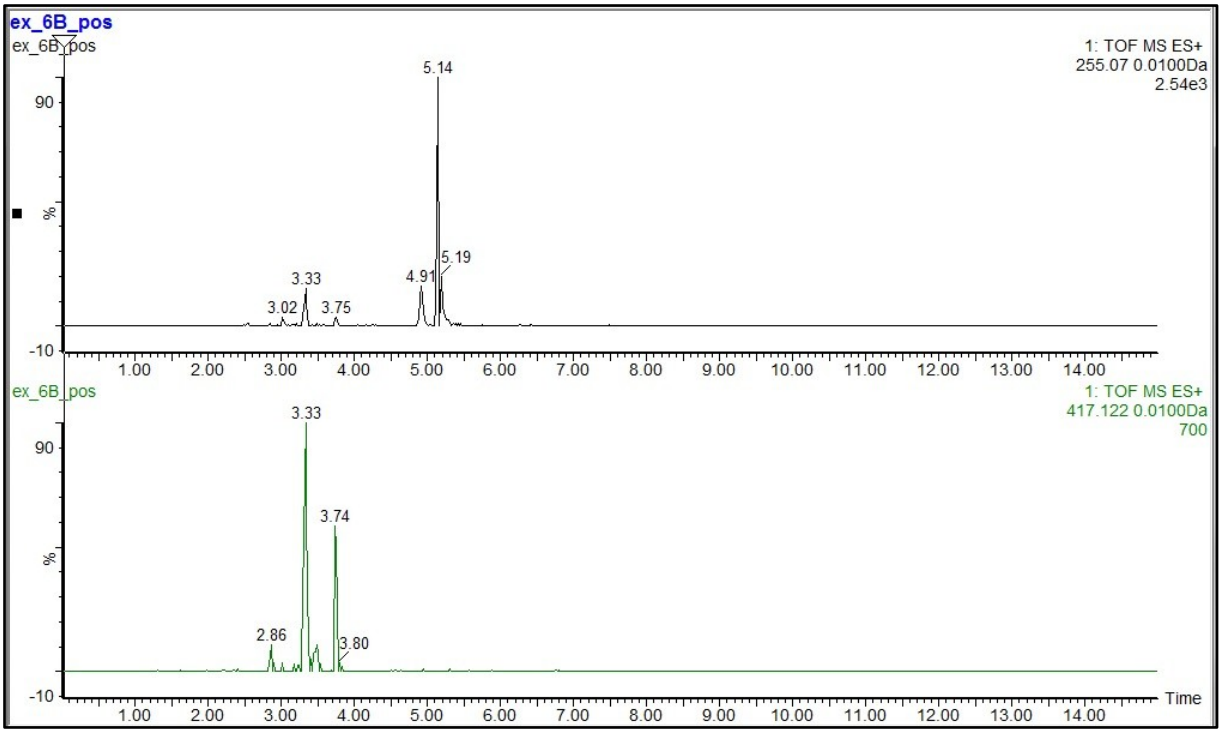
Obr. 12 MS spektrum píku s Rt: 5,16 min chromatogramu odrůdy Blauhilde a struktura daidzeinu s vypočtenou hmotností; (KE 5eV)



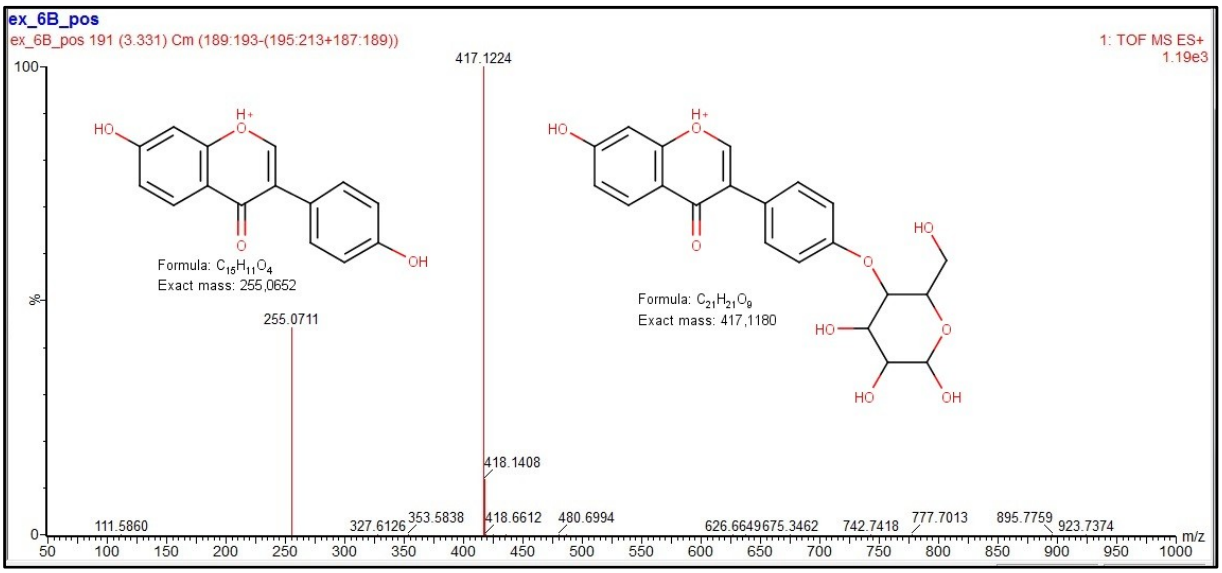
Obr. 13 Porovnání MRM přechodů a jejich retenčních časů pro daidzein. Kalibrační roztok s koncentrací 40 $mg \cdot l^{-1}$ nahoře, extrakt kontrolního vzorku odrůdy Carmen uprostřed a extrakt kontrolního vzorku odrůdy Blauhilde dole; (KE 30eV)

4.1.3 Daidzeinhexosid

Tato glykosylovaná forma daidzeinu byla identifikována pouze v odrůdě Carmen. Z rekonstruovaných chromatografů pro vypočtenou hmotnost daidzeinu a daidzeinhexosidu na Obr. 14, je zřetelná shoda retenčních časů (3,33 min) a symetrie píků pro obě hmoty. Tato skutečnost potvrzuje náležitost obou hmot stejné látce a jejímu rozpadu při ionizaci. MS spektrum tohoto píku na Obr. 15 dokazuje, že se v daném čase nedochází k eluci dalších hmot, jež by zpochybňovaly naši interpretaci.



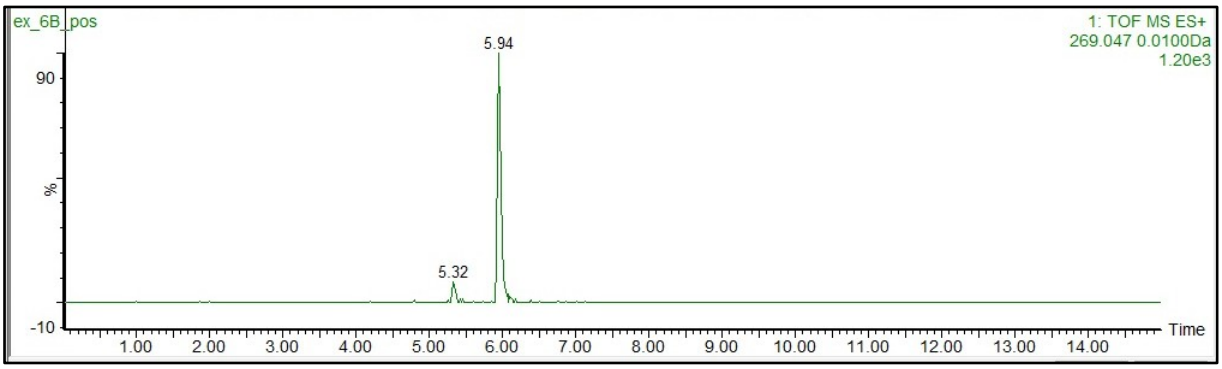
Obr. 14 Porovnání rekonstruovaných chromatogramů pro vypočtenou teoretickou hmotnost daidzeinu a daidzeinhexosidu (ze zhora) ve vzorku odrůdy Carmen; (KE 5eV)



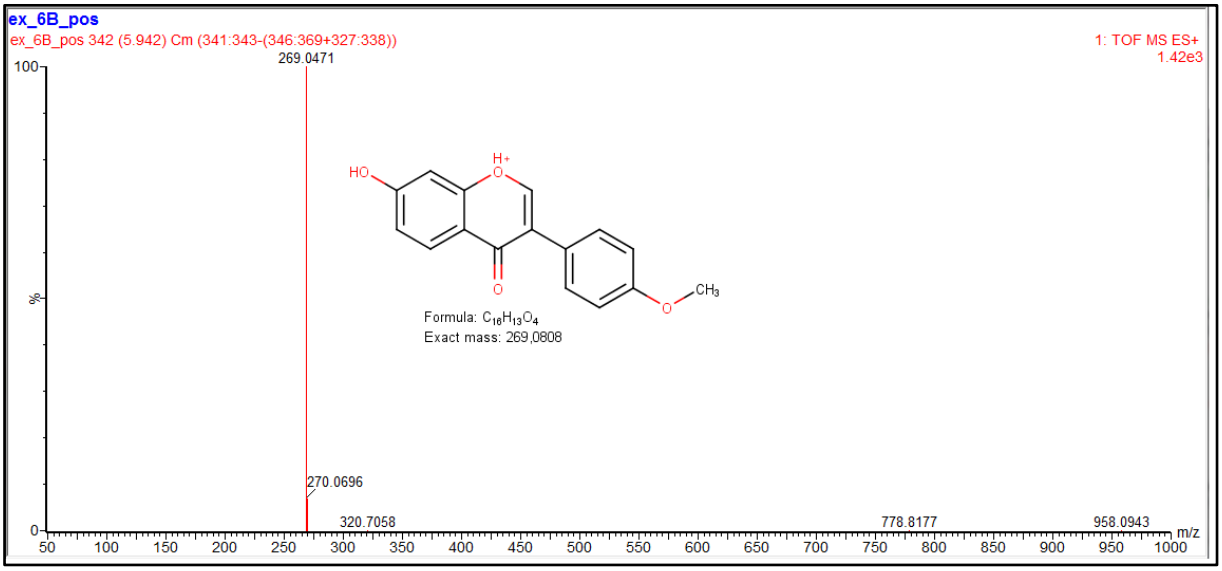
Obr. 15 MS spektrum píku s Rt: 3,33 min chromatogramu odrůdy Carmen a struktura daidzeinu a daidzeinhexosidu (z leva) s vypočtenou hmotností; (KE 5eV)

4.1.4 Formononetin

Přítomnost formononetinu byla zjištěna pouze u odrůdy Carmen. Je to jediný námi identifikovaný flavanoid, nepočítáme-li glykosylované formy, který není společný obou odrůdám. Jeho identifikace proběhla na základě měření správné a přesné hmotnosti, rekonstruovaný chromatogram je znázorněn na Obr. 16, dále pak na základě interpretace MS spektra píku s retenčním časem 5,94 min (Obr. 17). Standard formononetinu jsme neměli k dispozici, z tohoto důvodu nemohlo dojít k potvrzení identifikace na základě MRM přechodů a porovnání retenčních časů.



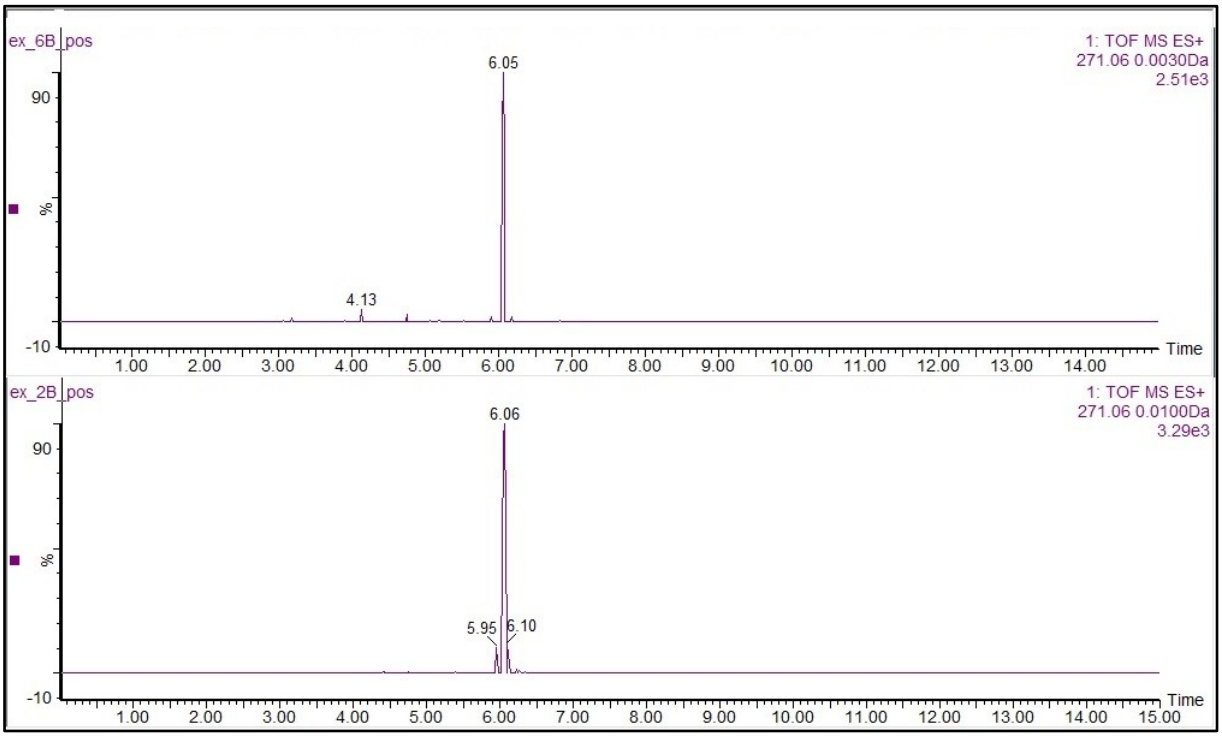
Obr. 16 Rekonstruovaný chromatogram pro vypočtenou hmotnost formononetinu ve vzorku odrůdy Carmen; (KE 5 eV)



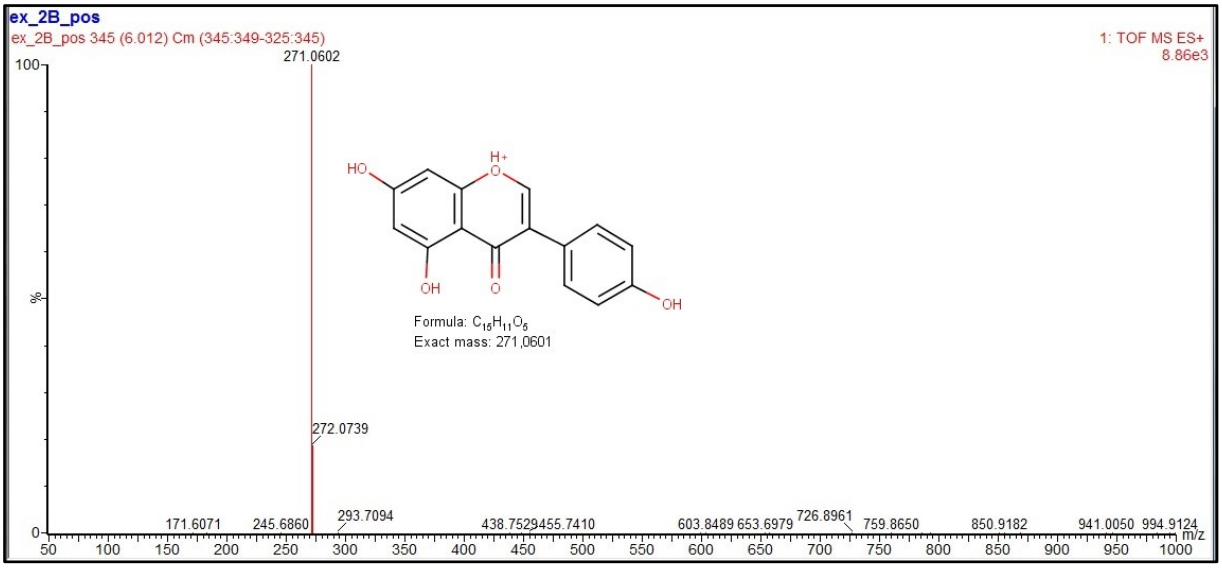
Obr. 17 MS spektrum píku Rt: 5,94 min chromatogramu odrůdy Carmen a struktura formononetisu s vypočtenou hmotností; (KE 5 eV)

4.1.5 Genistein

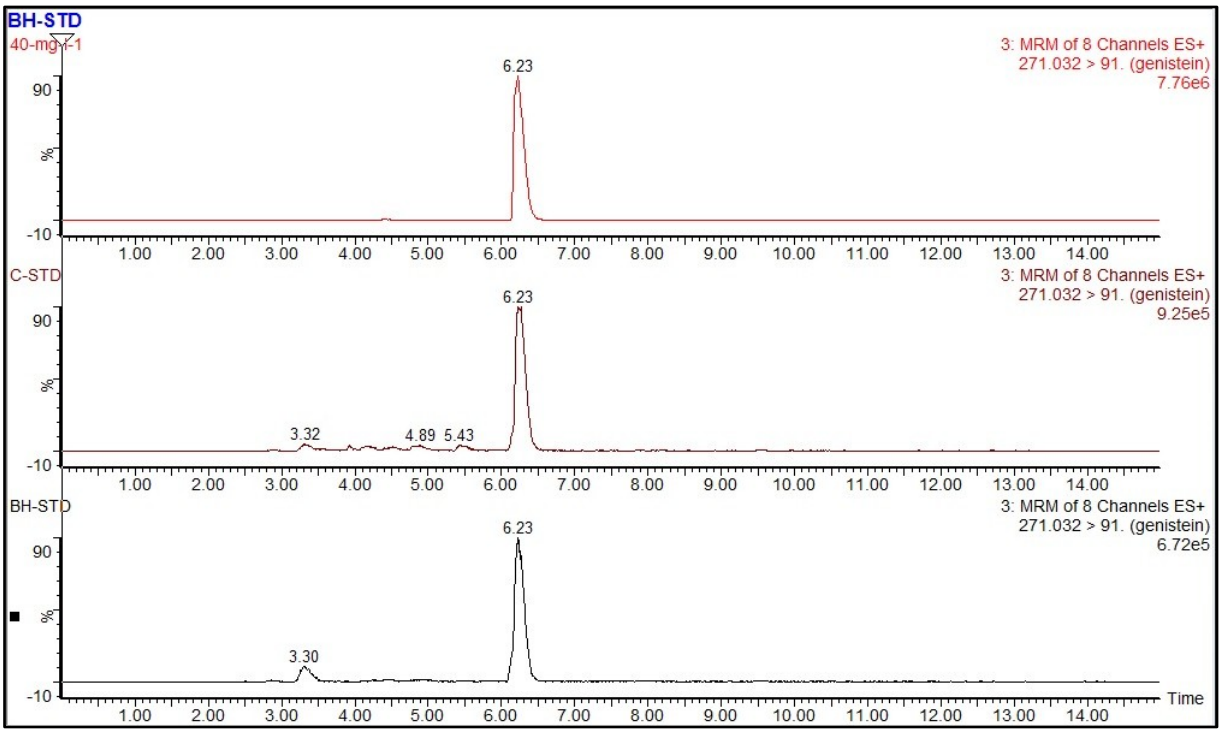
Genistein byl identifikován v obou námi zkoumaných odrůdách a to pouze ve formě aglykonu. Tuto skutečnost je doložena jediným píkem v rekonstruovaném chromatogramu pro vypočtenou hmotnost genisetinu a shodou retenčních časů píků v chromatogramech obou odrůd, viz Obr. 18. K přesné identifikaci genisteinu bylo využito měření přesné a správné hmoty, dále pak interpretaci MS spektra píku s retenčním časem 6,05 min (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**) a porovnání MSM přechodů a retenčních časů genisteinu v našich vzorcích se standardem z kalibračního roztoku (obr. 20).



Obr. 18 Porovnání retenčních časů v rekonstruovaných chromatogramech pro teoretickou hmotnost genisteinu v extraktech z listů. Odrůda Carmen nahoře, odrůda Blauhilde dole; (KE 5eV)



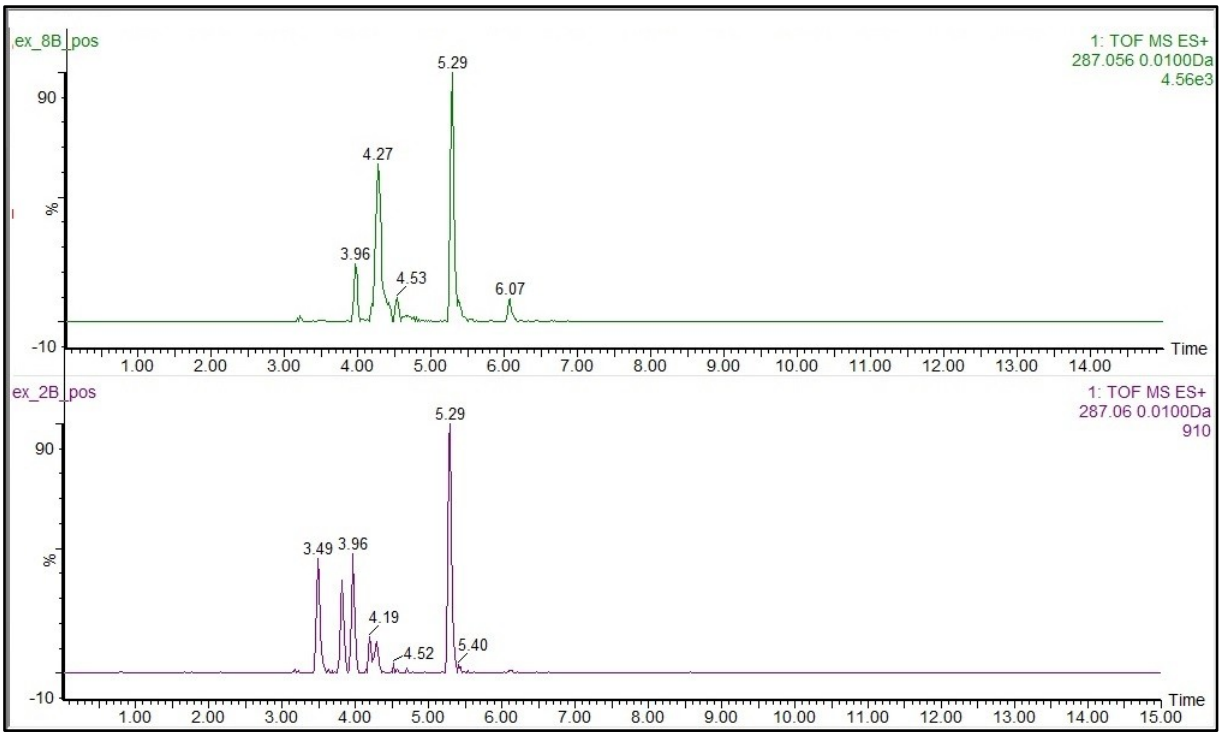
Obr. 19 MS spektrum píku s Rt: 6,06 min chromatogramu odrůdy Blauhilde a struktura genisteinu s vypočtenou hmotností; (KE 5 eV)



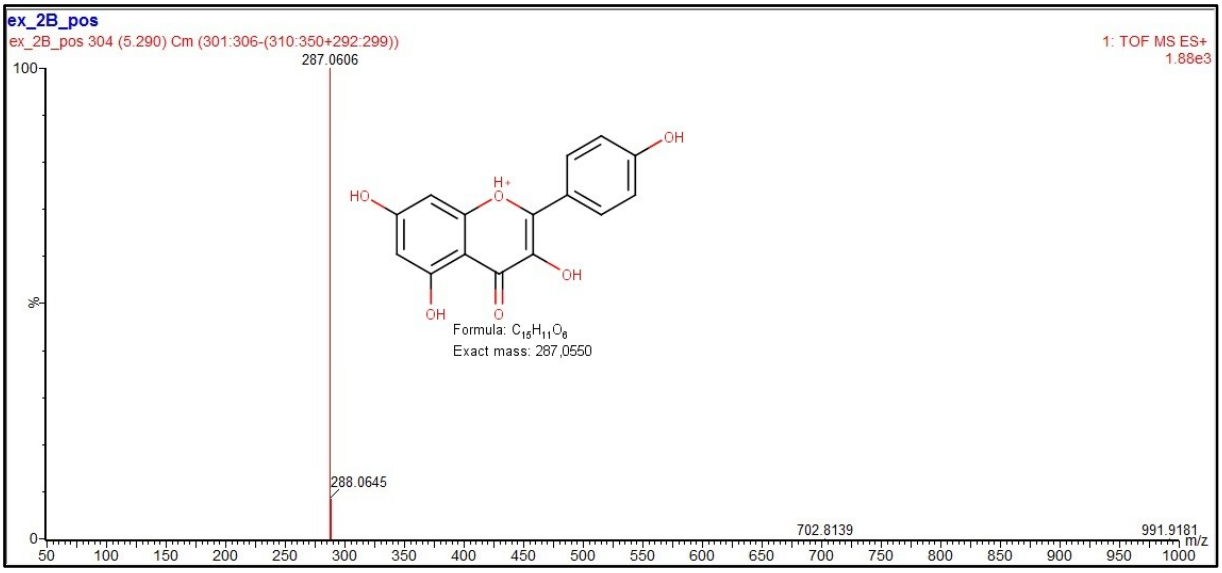
Obr. 20 Porovnání MRM přechodů a jejich retenčních časů pro genistein. Kalibrační roztok s koncentrací 40 $mg \cdot l^{-1}$ nahoře, extrakt kontrolního vzorku odrůdy Carmen uprostřed a extrakt kontrolního vzorku odrůdy Blauhilde dole; (KE 30eV)

4.1.6 Kaempferol

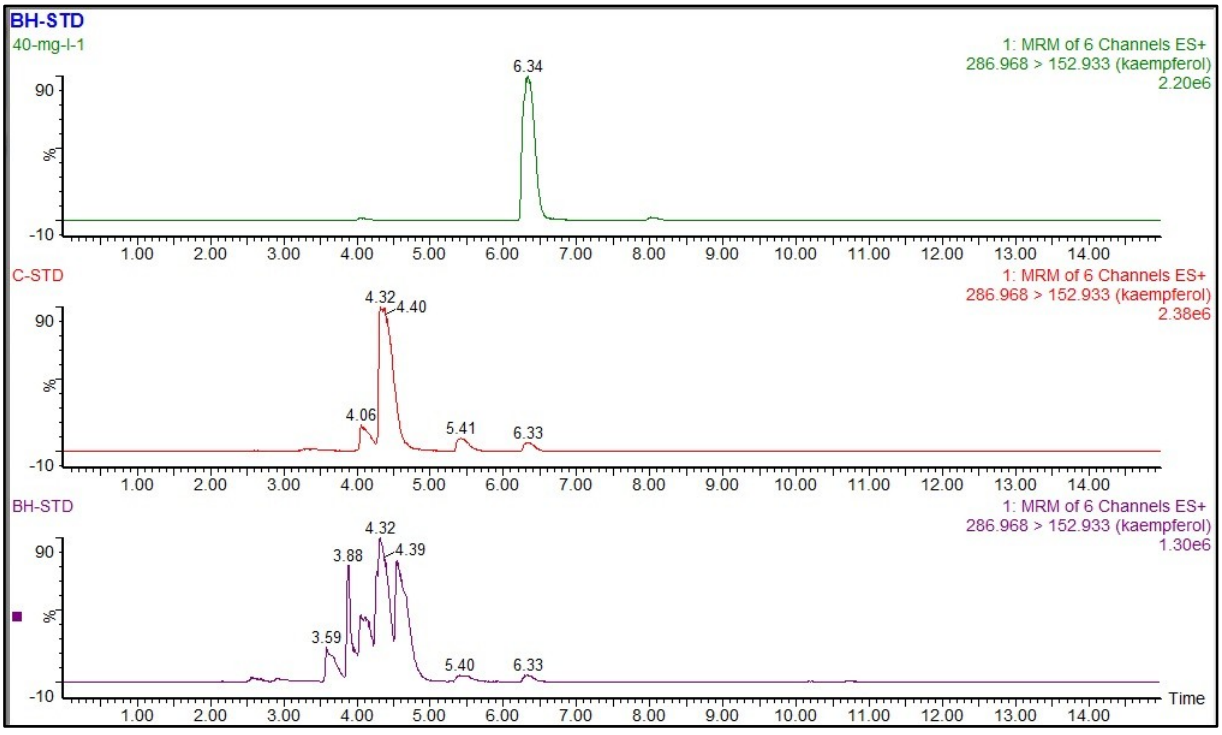
Keampferol byl identifikován v obou námi zkoumaných odrůdách fazolu ve formě aglykonu. Dále pak bylo identifikováno i několik jeho glykosylovaných forem, jež se mezi zkoumanými odrůdami mírně lišily. Přítomnost více forem kaempferolu je zřetelná z rekonstruovaných chromatogramů pro vypočtenou hmotnost keampferolu (obr. 21), které obsahují větší množství píků pro danou hmotnost. Aglykon byl identifikován na základě interpretace MS spektra píku s retenčním časem 5,29 min (obr. 22), z kterého je patrné, že v daném retenčním čase není detekována žádná další hmota s identickou symetrií píku. Dalším důkazem o přítomnosti aglykonu v našich vzorcích jsou i chromatogramy MRM přechodů kaempferolu (obr. 23). Na tomto obrázku je viditelná shoda retenčního času MRM přechodů (6,33 min) pro naše vzorky a standard kaempferolu z kalibračního roztoku.



Obr. 21 Porovnání retenčních časů v rekonstruovaných chromatogramech pro teoretickou hmotnost kaempferolu v extraktech z listů. Odrůda Carmen nahoře, odrůda Blauhilde dole; (KE 5eV)



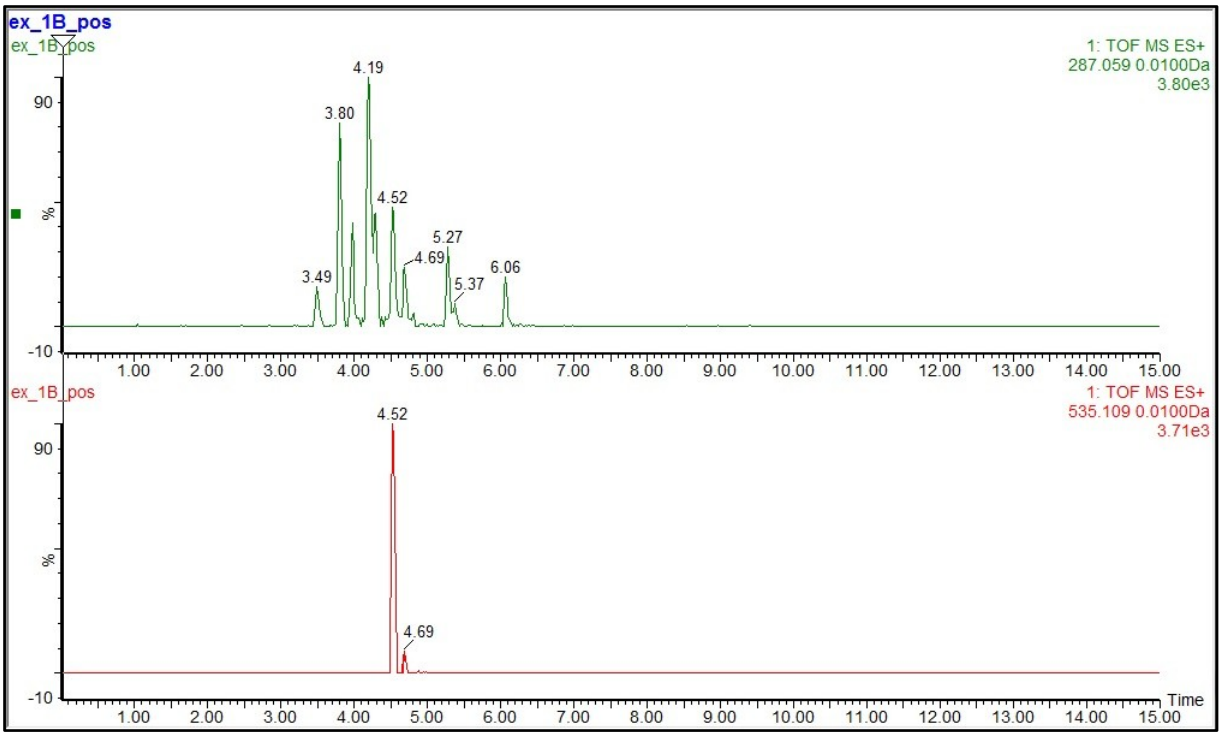
Obr. 22 MS spektrum píku s Rt: 5,29 min chromatogramu odrůdy Blauhilde a struktura kaempferolu s vypočtenou hmotností; (KE 5 eV)



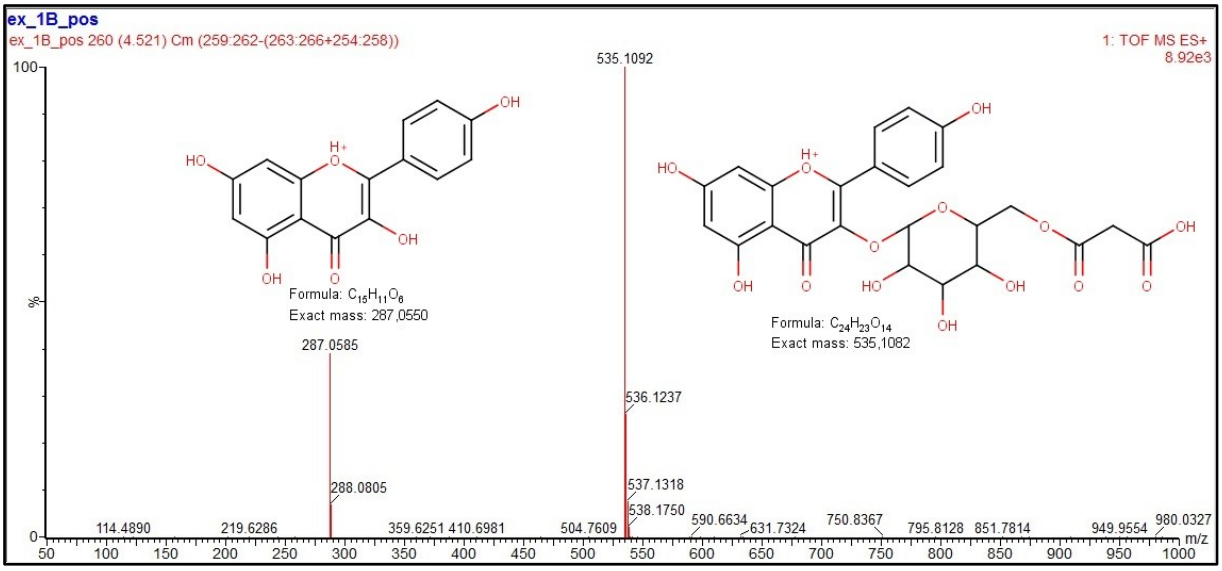
Obr. 23 Porovnání MRM přechodů a jejich retenčních časů pro kaempferol. Kalibrační roztok s koncentrací 40 $mg \cdot l^{-1}$ nahoře, extrakt kontrolního vzorku odrůdy Carmen uprostřed a extrakt kontrolního vzorku odrůdy Blauhilde dole; (KE 30eV)

4.1.7 Kaempferol 3-O-)malonyl)glucoside

Jedná se glykosylovanou formu kampferolu, která je společná obou námi zkoumaným odrůdám fazolu. Z rekonstruovaného chromatogramu pro vypočtenou hmotnost kaempferolu a kaempferolu 3-O-(malonyl)glucosidu na Obr. 24 je vidět, že píky s retenčním časem 4,52 min náleží jedné látce a k odštěpení cukernatého zbytku dochází během ionizace. Identifikace byla potvrzena na základě interpretace MS spektra tohoto píku (obr. 25).



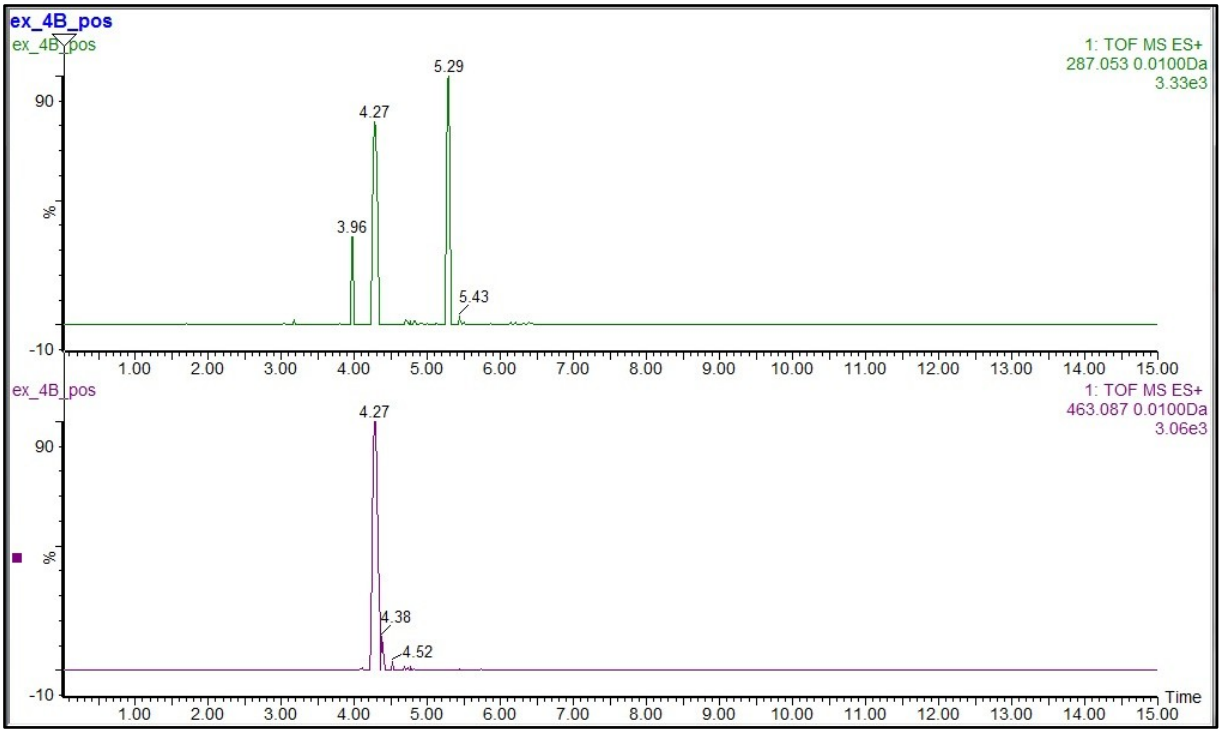
Obr. 24 Porovnání rekonstruovaných chromatogramů pro vypočtenou teoretickou hmotnost kaempferolu a kaempferol 3-O-(malonyl)gucosidu (ze zhora) ve vzorku odrůdy Blauhilde; (KE 5eV)



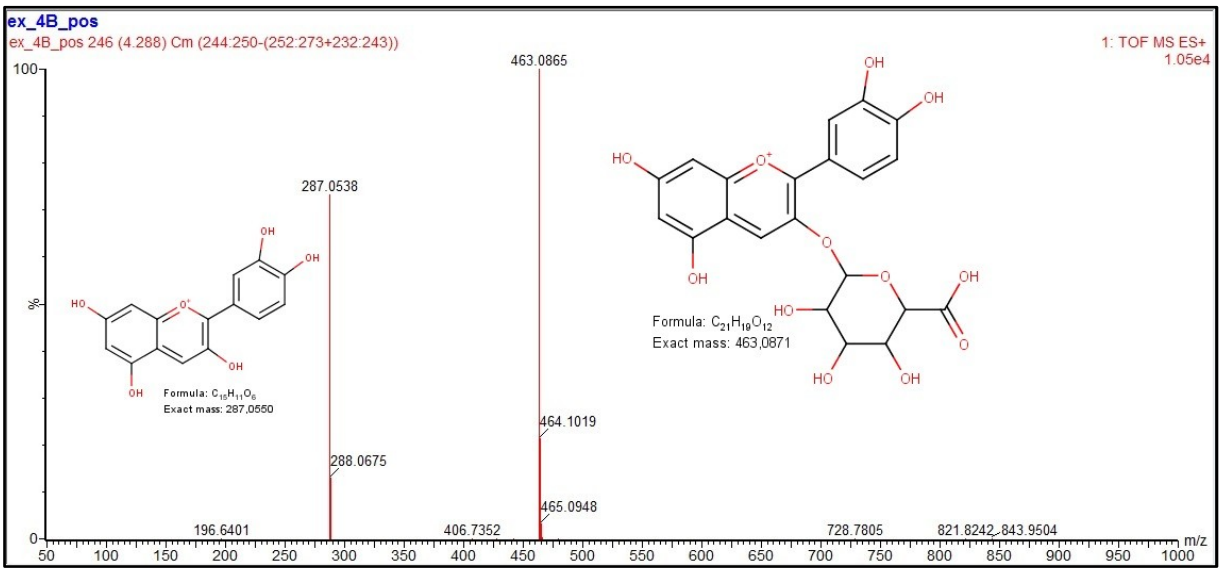
Obr. 25 MS spektrum písku s Rt: 4,52 min chromatogramu odrůdy Blauhilde a struktura s vypočtenou hmotností pro kaempferol a kaempferol 3-O-(malonyl)glocoside (z leva); (KE 5eV)

4.1.8 Kaempferol 3-O-glukuronid

Tato glykosylovaná forma kaempferolu by nalezena a identifikována pouze o odrůdy Carmen. Kaempferol 3-O-glukuronid byl identifikován na základě měření správné a přesné hmotnosti. Na obr. 26 jsou vidět rekonstruované chromatogramy pro vypočtenou hmotnost kaempferolu a kaempferol 3-O-glukuronidu. Porovnáním symetrie píků s retenčním časem 4,27 min je zřejmé, že se jedná o jednu látku. Identifikace je potvrzena interpretací MS spektra tohoto píku, z kterého také vyplývá, že v daném čase nedochází k eluci žádných jiných hmot se stejnou symetrií píku.



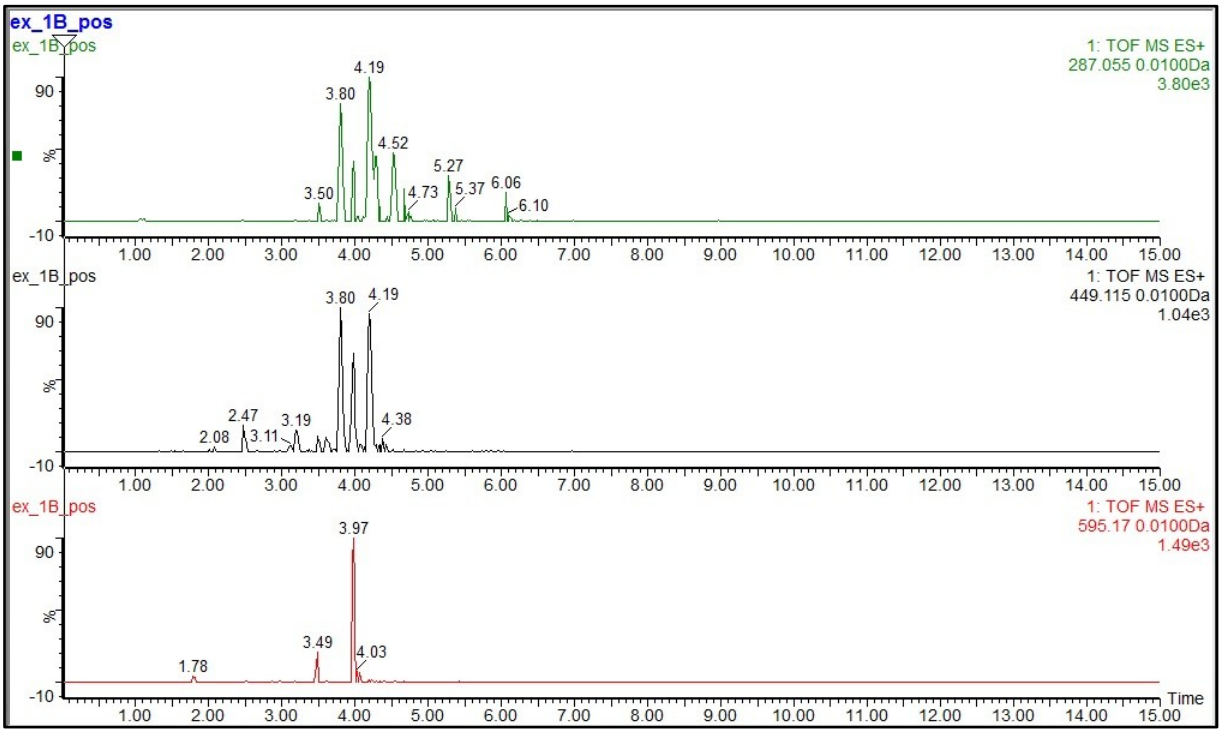
Obr. 26 Porovnání rekonstruovaných chromatogramů pro vypočtenou teoretickou hmotnost kaempferolu a kaempferol 3-O-glukuronidu (ze shora) ve vzorku odrůdy Carmen; (KE 5eV)



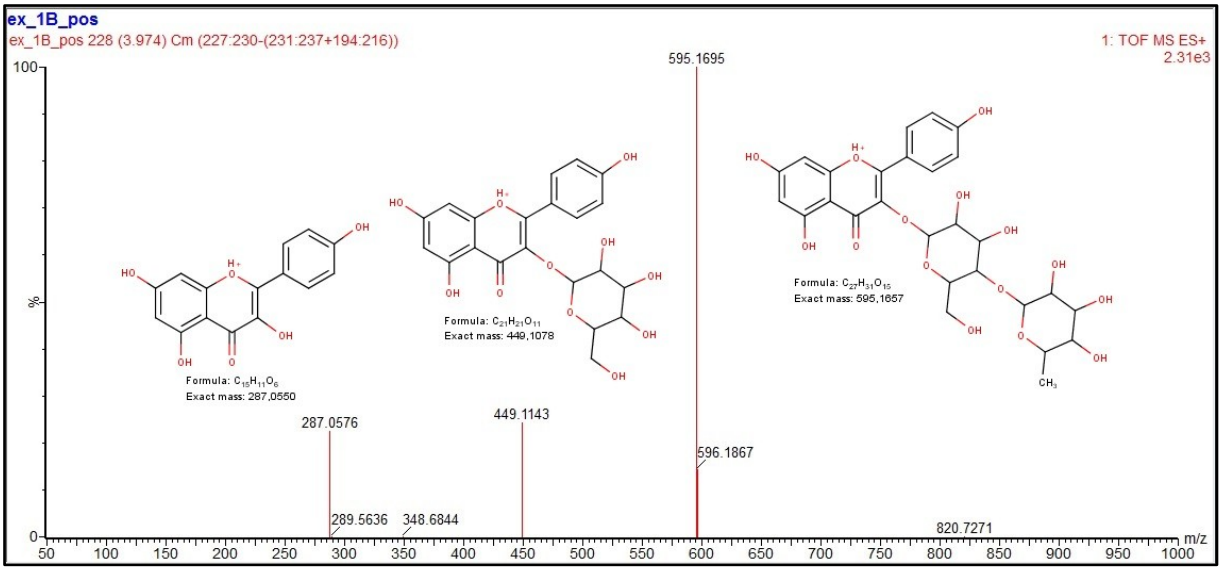
Obr. 27 MS spektrum písku s Rt: 4,27 min chromatogramu odrůdy Carmen a struktura s vypočtenou hmotností pro kaempferol a kaempferol 3-O-glukuronidu (z leva); (KE 5eV)

4.1.9 Kaempferolmethylpentosylhexosid

Kaempferolmethylpentosylhexosid je glykosylovaný kaempferol, který je společný oběma námi pěstovaným odrůdám fazolu. Pro rekonstruovaný chromatogram jednotlivých vypočtených hmot nám posloužil kontrolní vzorek odrůdy Blauhilde, který byl v průběhu svého života zaléván pouze vodou (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**). Z tohoto obrázku je patrná shoda symetrie u píků s retenčním časem 3,97 min. Interpretací MS spektra tohoto píku byla potvrzena přítomnost keampferolumethylpentosylhexosidu v našich vzorcích (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**).



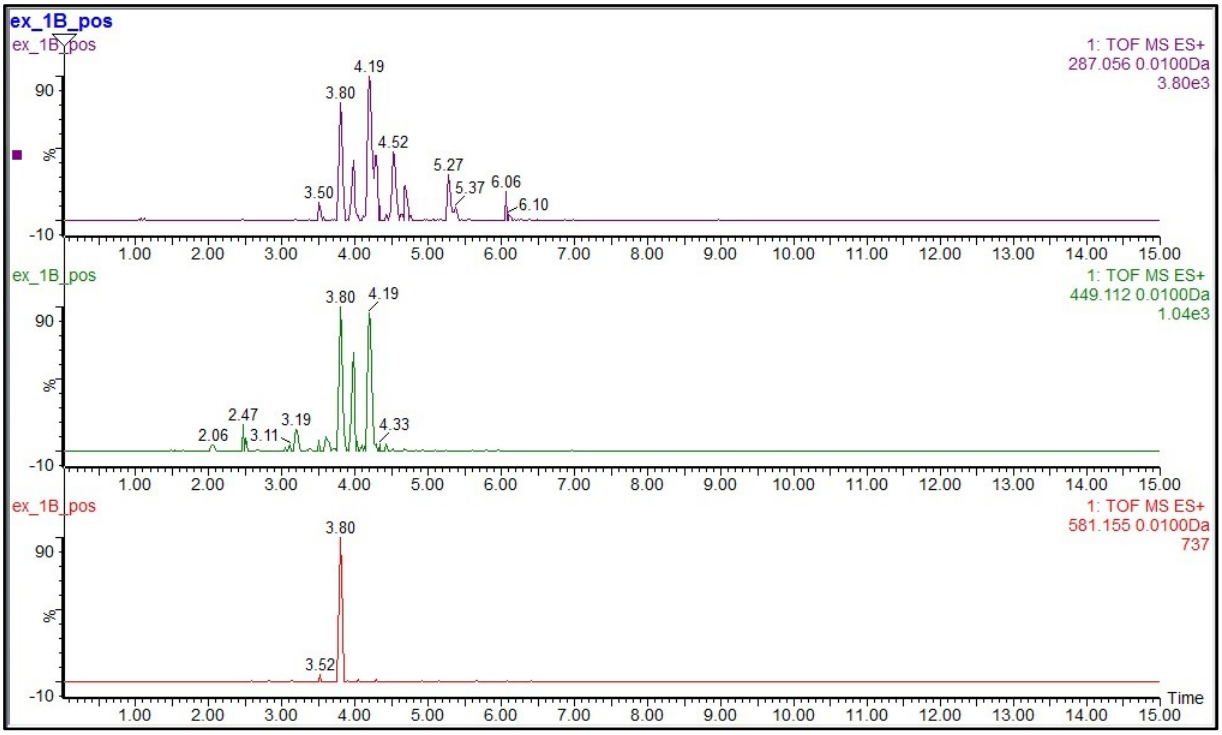
Obr. 28 Porovnání rekonstruovaných chromatogramů pro vypočtenou teoretickou hmotnost kaempferolu, kaempferolhexosidu a kaempferolmethylpentosylhexosidu (z vrchu) ve vzorku odrůdy Blauhilde;(KE 5eV)



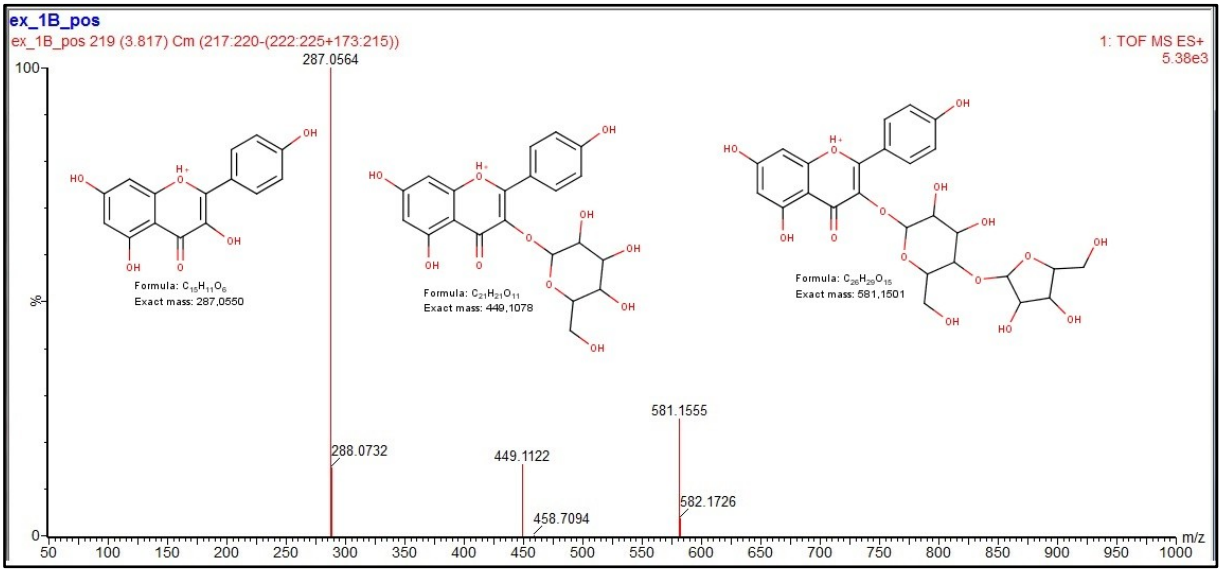
Obr. 29 MS spektrum píku s Rt: 3,97 min chromatogramu odrůdy Blauhilde se strukturami a vypočtenými hmotnostmi pro kaempferol, kaempferolhexosid a kaempferolmethylpentosylhexosidu (z leva); (KE 5 eV)

4.1.10 Kaempferolhexosylpentosy

Posledním zástupcem glykosylovaného kaempferolu v našich vzorcích je kaempferol-hexosylpentosy, který byl identifikován pouze v odrůdě Blauhilde. Z obrázku s rekonstruovanými chromatogramy pro vypočtené hmotnosti jednotlivých fragmentů tohoto flavanoidu (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**) jde vidět, že kaempferol a kaempferolhexosa je součástí více flavanoidů. Zatímco na chromatogramu pro kaempferolhexosylpentosy je pouze jeden pík. Shoda retenčních časů (3,80 min) a symetrie píku napovídá, že jde o jednu látku, která je štěpena v iontovém zdroji. Ke správné identifikaci flavanoidu přispěla interpretace MS spektra tohoto píku (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**).



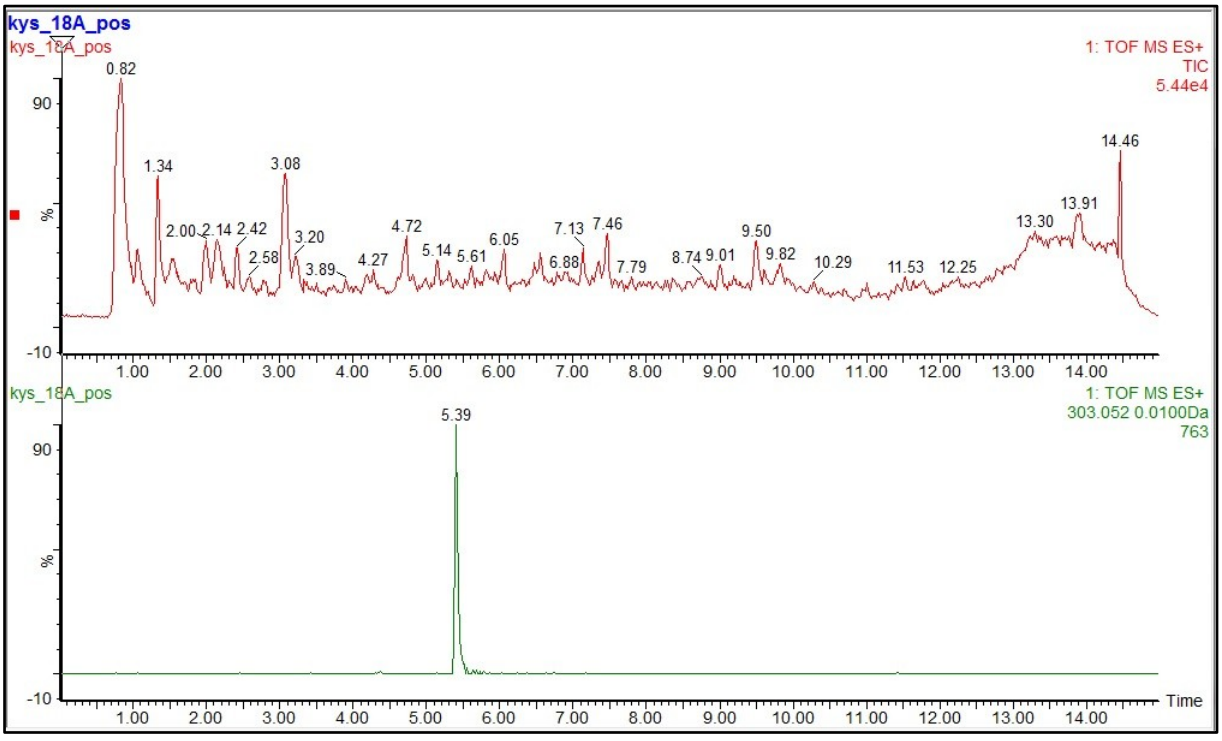
Obr. 30 Porovnání rekonstruovaných chromatogramů pro vypočtenou teoretickou hmotnost kaempferolu, kaempferolhexosidu a kaempferolhexosylpentosy (z vrchu) ve vzorku odrůdy Blauhilde; (KE 5eV)



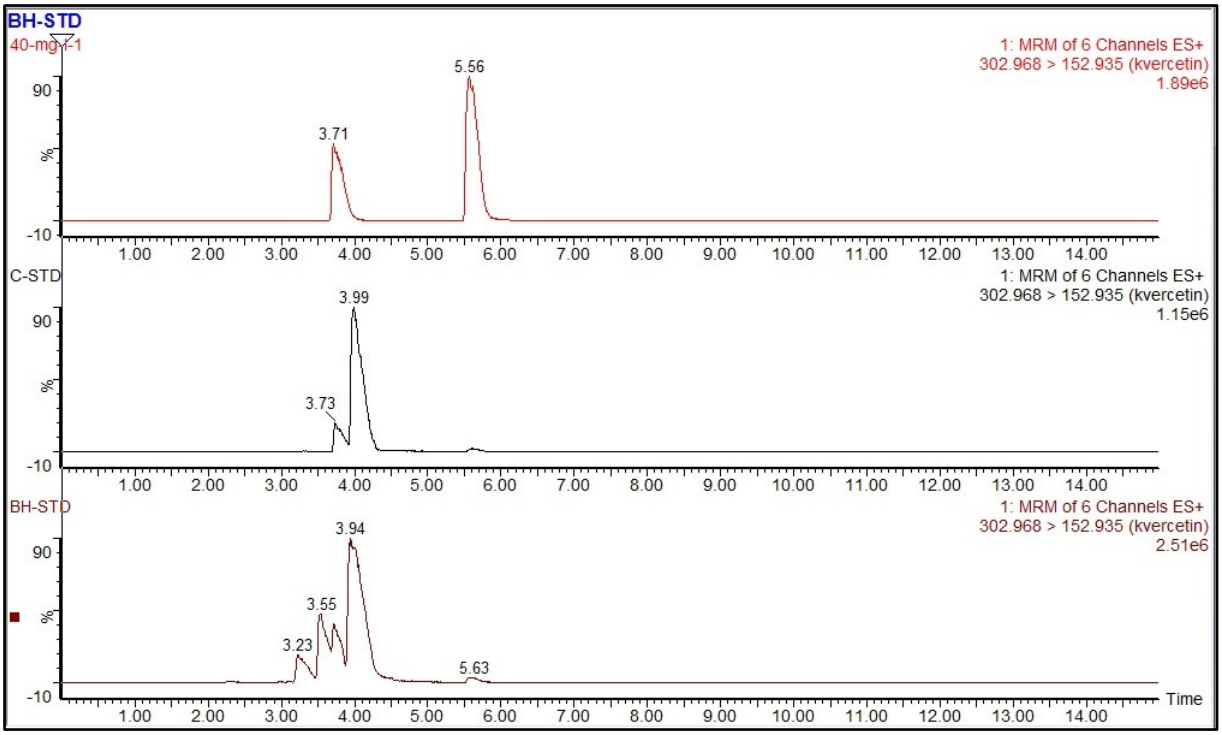
Obr. 31 MS spektrum píku s Rt: 3,8 min chromatogramu odrůdy Blauhilde se strukturami a vypočtenými hmotnostmi pro kaempferol, kaempferolhexosid a kaempferolhexosylpentosy (z leva); (KE 5 eV)

4.1.11 Quercetin

Quercetin je flavanoidem, který byl nalezen v obou námi zkoumaných odrůdách fazolu, ovšem pouze ve formě glykosidů. Přítomnost qercetinu byla prokázána ve vzorcích po kyselé hydrolýze, při které dochází k odštěpení cukernatých zbytků ze struktury flavanoidu. Na Obr. 32 je vidět TIC chromatogram vzorku odrůdy Carmena po kyselé hydrolýze a rekonstruovaný chromatogram pro vypočtenou hmotnost quercetinu. Přítomnost qercetinu v našich vzorcích byla dále potvrzena shodu MRM přechodů pro standard qercenitu v kalibrační roztoku a pro naše vzorky (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**). V horní části tohoto obrázku je chromatogram MRM přechodů pro kalibrační roztok, který obsahuje dva píky. Toto je způsobeno přítomností rutinu (quercetin rutinosidu) v kalibračním roztoku. Dále je z obrázku patrné, že odrůda Blauhilde (spodní část obrázku) obsahuje více glykosydovaných forem quercetinu, než odrůda Carmen (prostřední část obrázku).



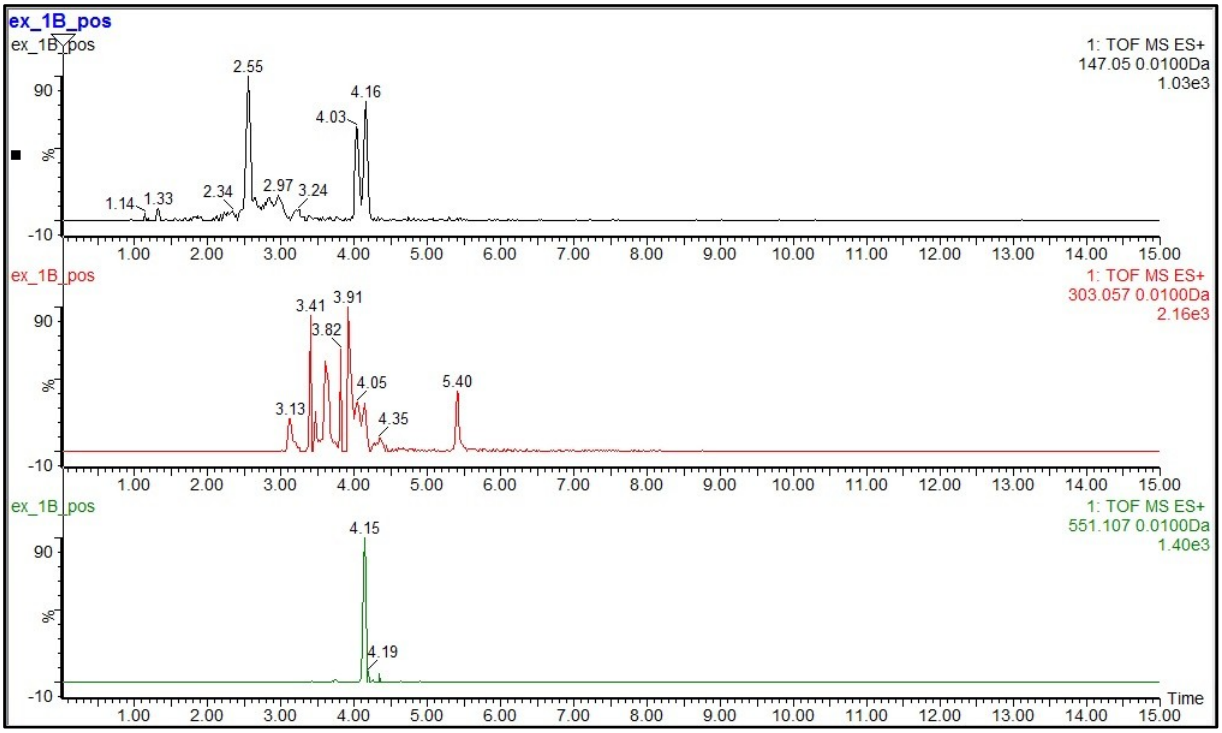
Obr. 32 Rekonstruovaný chromatogram pro vypočtenou hmotnost quercetinu ve vzorku odrůdy Carmen po kyselé hydrolýze; (KE 5 eV)



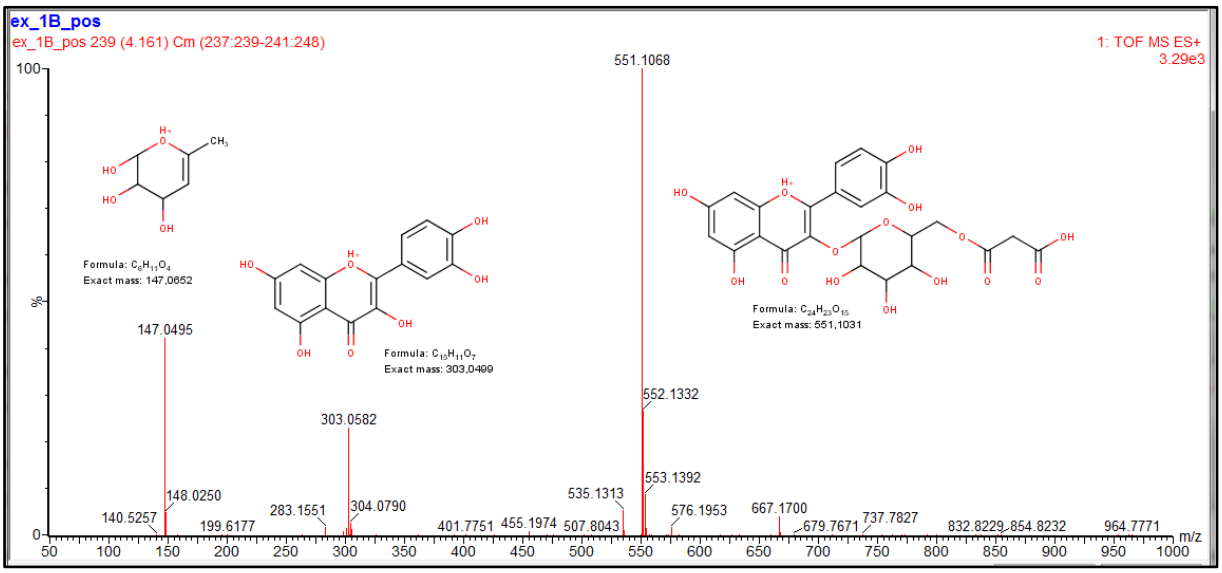
Obr. 33 Porovnání MRM přechodů a jejich retenčních časů pro quercetin. Kalibrační roztok s koncentrací 40 $mg \cdot l^{-1}$ nahoře, extrakt kontrolního vzorku odrůdy Carmen uprostřed a extrakt kontrolního vzorku odrůdy Blauhilde dole; (KE 30eV)

4.1.12 Quercetin 3-O-(malonyl)glucoside

Přítomnost quercetinu 3-O-(malonyl)glucosidu byla prokázána pouze u odrůdy Blauhilde a to na základě měření přesné a správné hmoty. Rekonstruovaný chromatogram pro vypočtené hmotnosti quercetin 3-O-(malonyl)glucosidu a jeho fragmentů je znázorněn na **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**. Chromatogramy pro hmotu 551, 107 a 147,05 jasně ukazují shodu retenčních časů (4,15 min) a symetrie píků. Rekonstruovaný chromatogram pro hmotu quercetinu (303,057) obsahuje pík v daném retenčním čase, avšak jeho symetrie je ovlivněna obsahem dalších glykosylovaných forem quercetinu ve vzorku. Není však pochyb o příslušnosti této hmoty k molekule quercetin 3-O-(malonyl)glucosidu. Identifikace byla provedena na základě interpretace MS spektra píku s retenčním časem 4,15 min (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**).



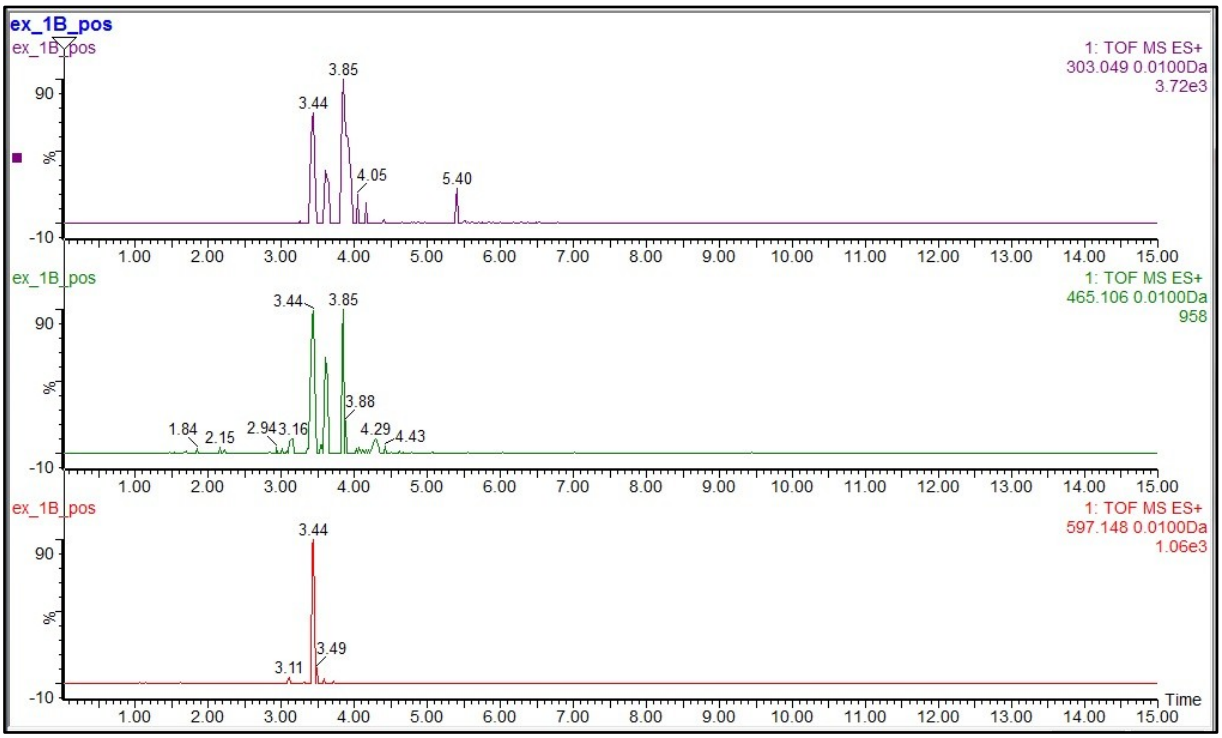
Obr. 34 Porovnání rekonstruovaných chromatogramů pro vypočtenou teoretickou hmotnost 6-methyl-3,4-dihydro-2H-pyran-triolu, quercetinu a quercetin 3-O-(malonyl)glucosidu (z vrchu) ve vzorku odrůdy Blauhilde; (KE 5eV)



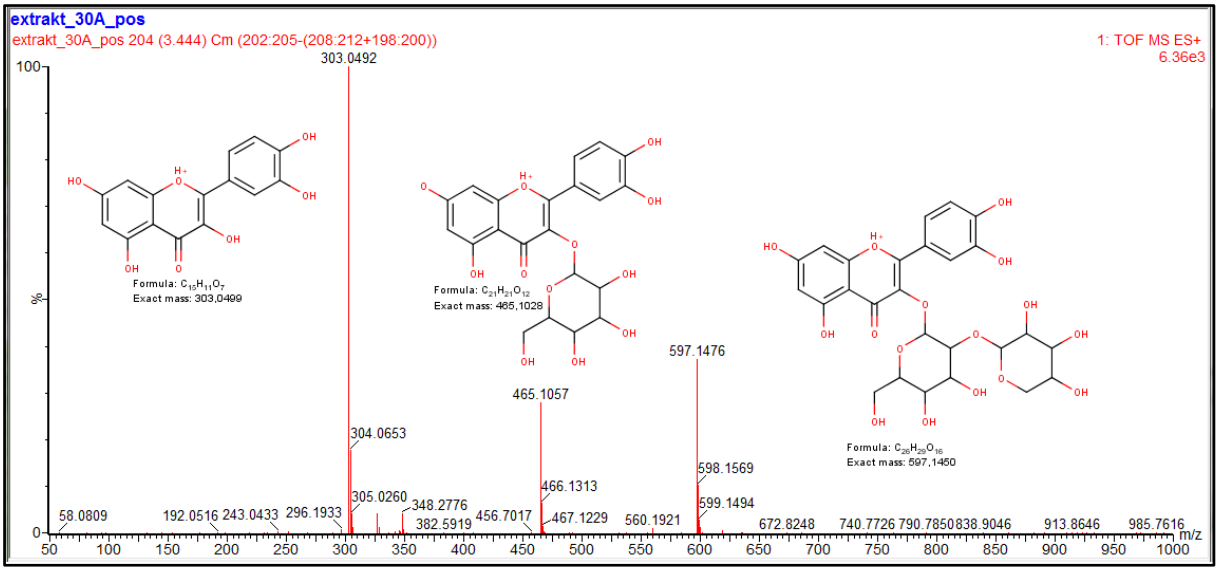
Obr. 35 MS spektrum píku s Rt: 4,15 min chromatogramu odrůdy Blauhilde se strukturami a vypočtenými hmotnostmi 6-methyl-3,4-dihydro-2H-pyran-triolu, quercetinu a quercetin 3-O-(malonyl)glucosidu (z leva); (KE 5 eV)

4.1.13 Quercetin 3-O-xylosylglucoside

Přítomnost quercetin 3-O-xylosylglucosidu byla taktéž prokázána pouze u odrůdy Blauhilde. Jeho identifikace byla provedena na základě měření přesné a správné hmoty. Rekonstruované chromatogramy pro vypočtené hmotnosti quercetin 3-O-xylosylglucosidu a jeho fragmentů jsou znázorněny na Obr. 36. Shoda symetrie píků s retenčním časem 3,44 min pro všechny hmoty poukazuje na fakt, že náleží jedné látce. MS spektrum tohoto píku (Obr. 37) dále dokazuje, že v tomto retenčním čase již nedochází k eluci jiných iontů se stejnou symetrií píku. Identifikace byla provedena na základě interpretace MS spektra.



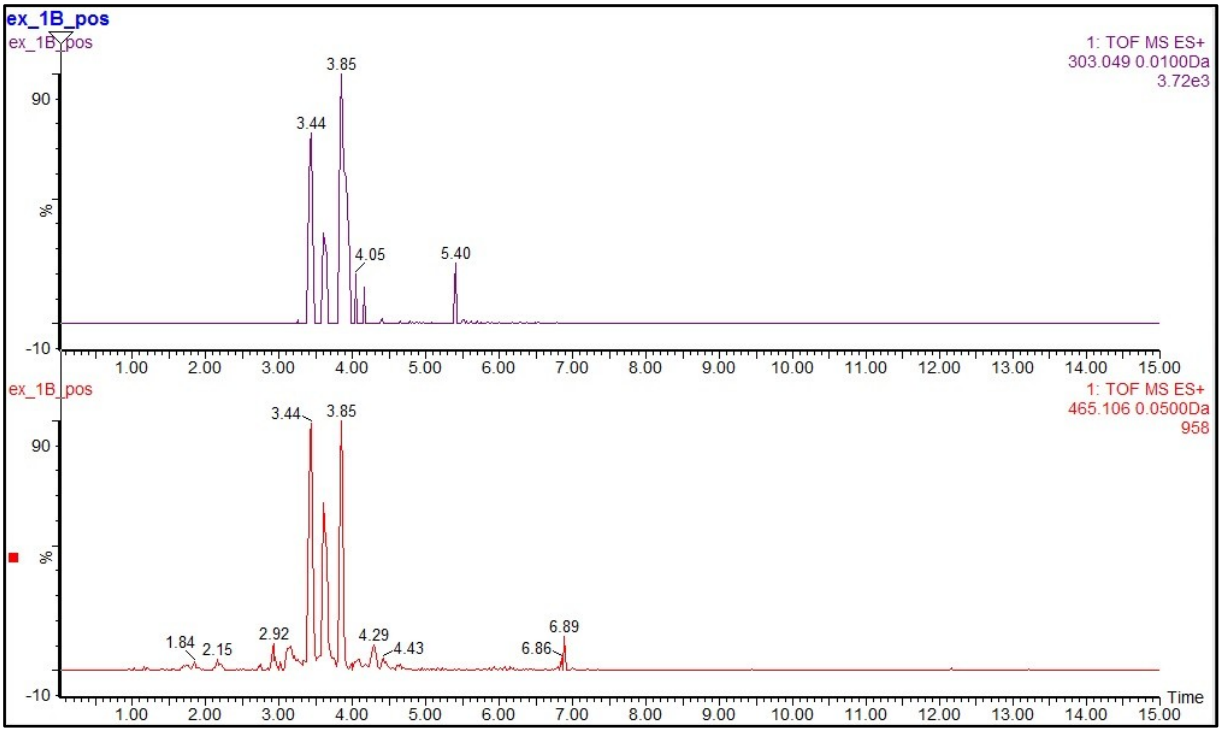
Obr. 36 Porovnání rekonstruovaných chromatogramů pro vypočtenou teoretickou hmotnost quercetinu, quercetinglucosidu a quercetinxylosilglucosidu (z vrchu) ve vzorku odrůdy Blauhilde; (KE 5eV)



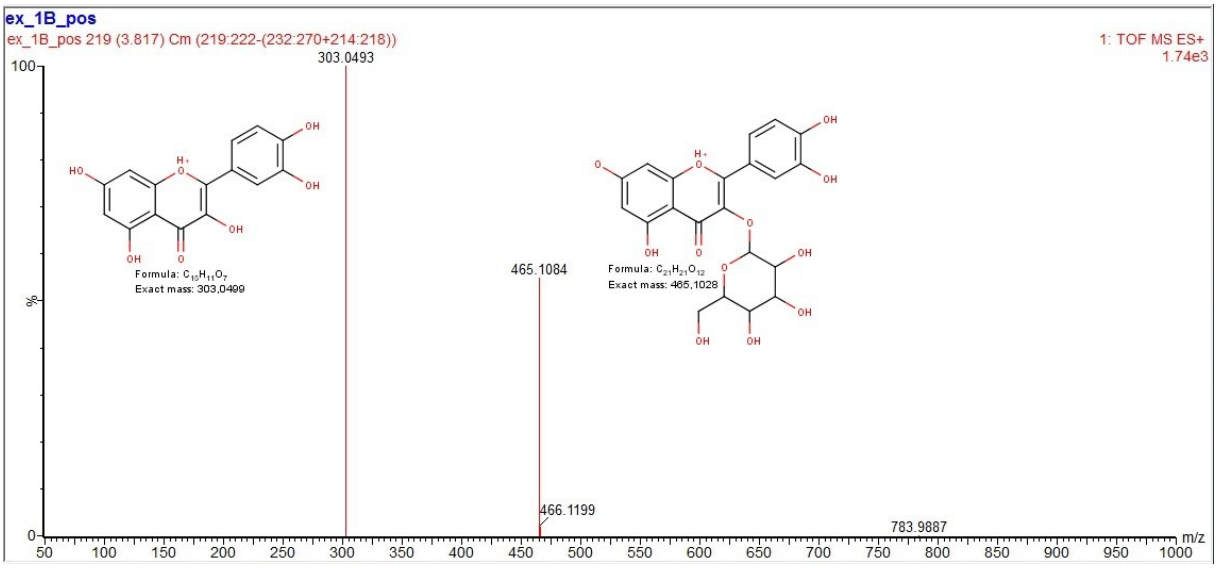
Obr. 37 MS spektrum píku s Rt: 3,44 min chromatogramu odrůdy Blauhilde se strukturami a vypočtenými hmotnostmi quercetinu, quercetinglucosidu a quercetinxylosilglucosidu (z leva); (KE 5 eV)

4.1.14 Quercetinhexosid

Quercetinhexosid je dalším flavanoidem přítomným pouze v odrůdě Blauhilde. Při pohledu na rekonstruované chromatogramy pro vypočtenou hmotnost quercetinhexosidu a qercetinu v extraktu z kontrolní rostliny (Obr. 39), je zřejmé, že oba flavanoidy jsou základem pro další struktury. MS spektrum píku s retenčním časem 3,85 min (Obr. 39) však dokazuje, že v daném retenčním čase nedochází k eluci žádné jiné hmoty se stejnou symetrií píku. Na základě interpretace tohoto MS spektra lze potvrdit přítomnost Quercetinhexosidu v našich vzorcích.



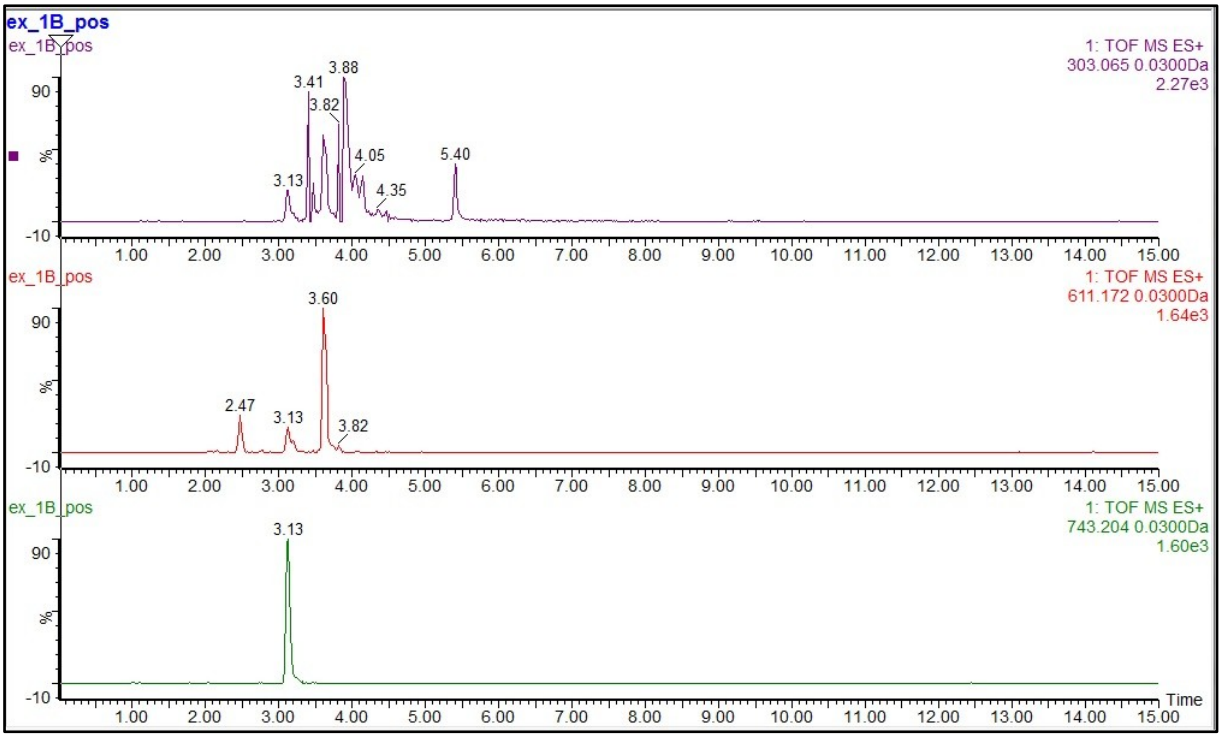
Obr. 38 Porovnání rekonstruovaných chromatogramů pro vypočtenou teoretickou hmotnost quercetinu (nahoře) a quercetinhexosidu (dole) ve vzorku odrůdy Blauhilde; (KE 5eV)



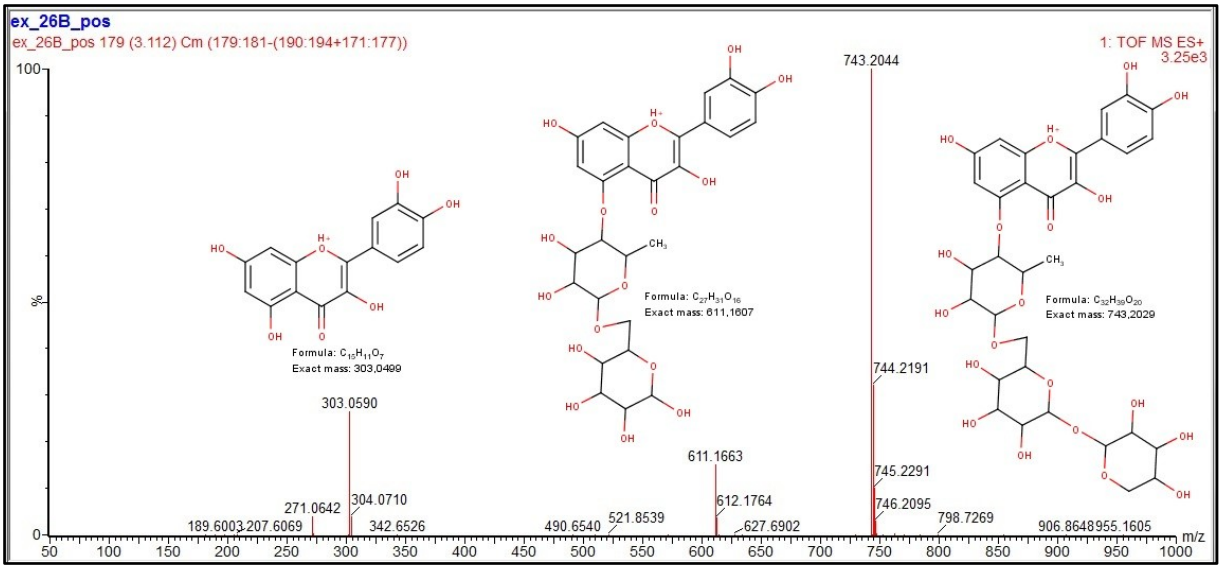
Obr. 39 MS spektrum píku s Rt: 3,85 min chromatogramu odrůdy Blauhilde a struktury s vypočtenými hmotnostmi pro quercetin (na levo) a qercetinhexosid (na pravo); (KE 5 eV)

4.1.15 Quercetinxylosylrutinosid

Posledním glykosylovanou formou quercetinu, přítomnou pouze u odrůdy Blauhilde, je quercetinxylosylrutinosid. Na **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.** jsou znázorněny rekonstruované chromatogramy pro vypočtené hmotnosti quercetinxylosilrutinosidu a jeho fragmentů. Pro tyto chromatogramy je společný pík s retenčním časem 3,13 min. Identifikace quercetinxylosylrutinosidu byla provedena na základě interpretace MS spektra tohoto píku (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**).



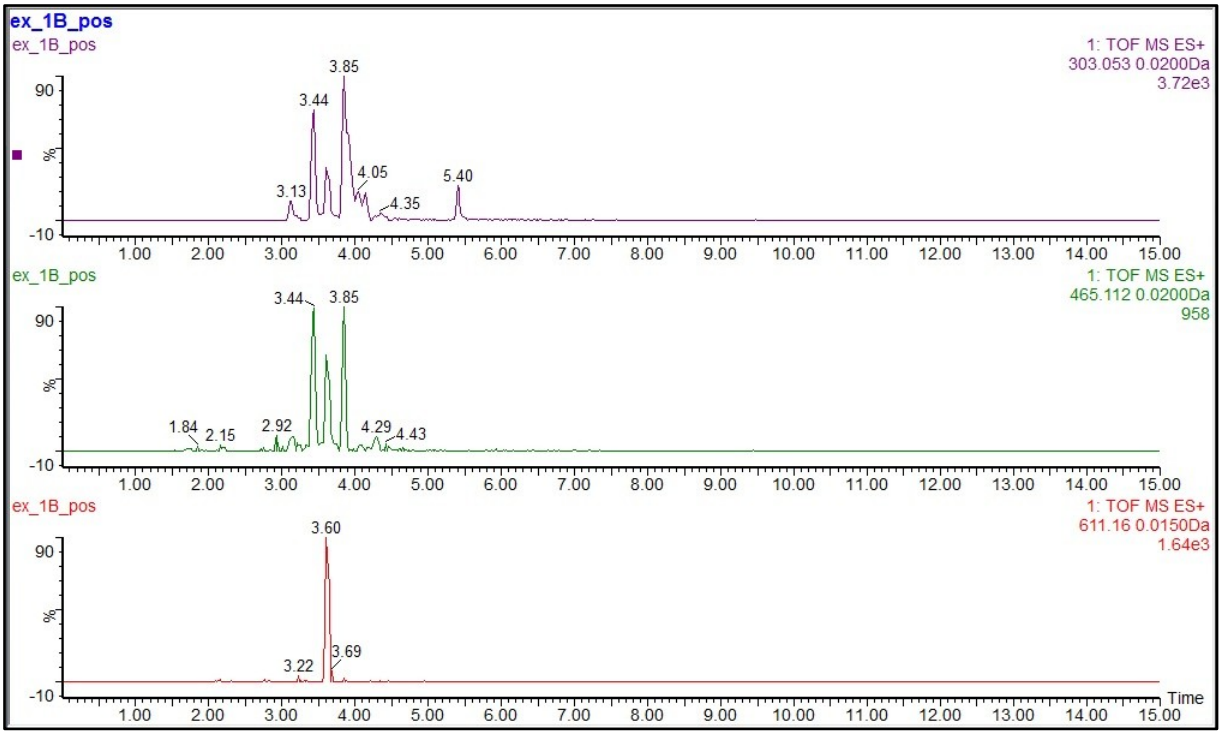
Obr. 40 Porovnání rekonstruovaných chromatogramů pro vypočtenou teoretickou hmotnost quercetinu, quercetrutinoside a quercetinxylosylrutinoside (z vrchu) ve vzorku odrůdy Blauhilde; (KE 5 eV)



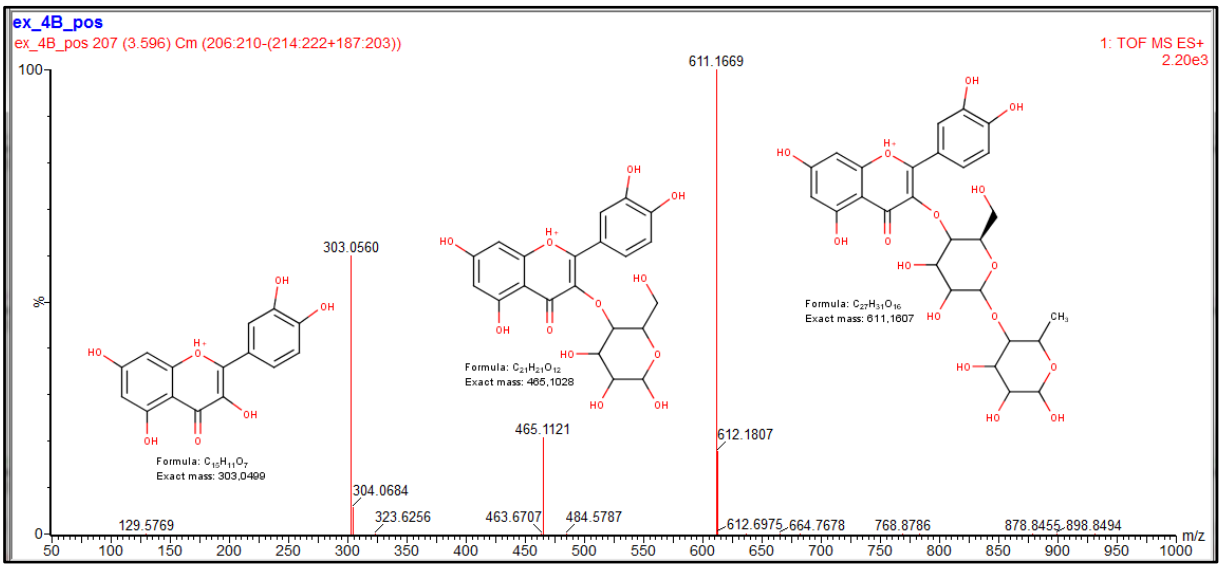
Obr. 41 MS spektrum píku s Rt: 3,13 min chromatogramu odrůdy Blauhilde se strukturami a vypočtenými hmotnostmi pro quercetinu, quercetrutinoside a quercetinxylosylrutinoside (z leva); (KE 5 eV)

4.1.16 Quercetinmethylpentosylhexosy

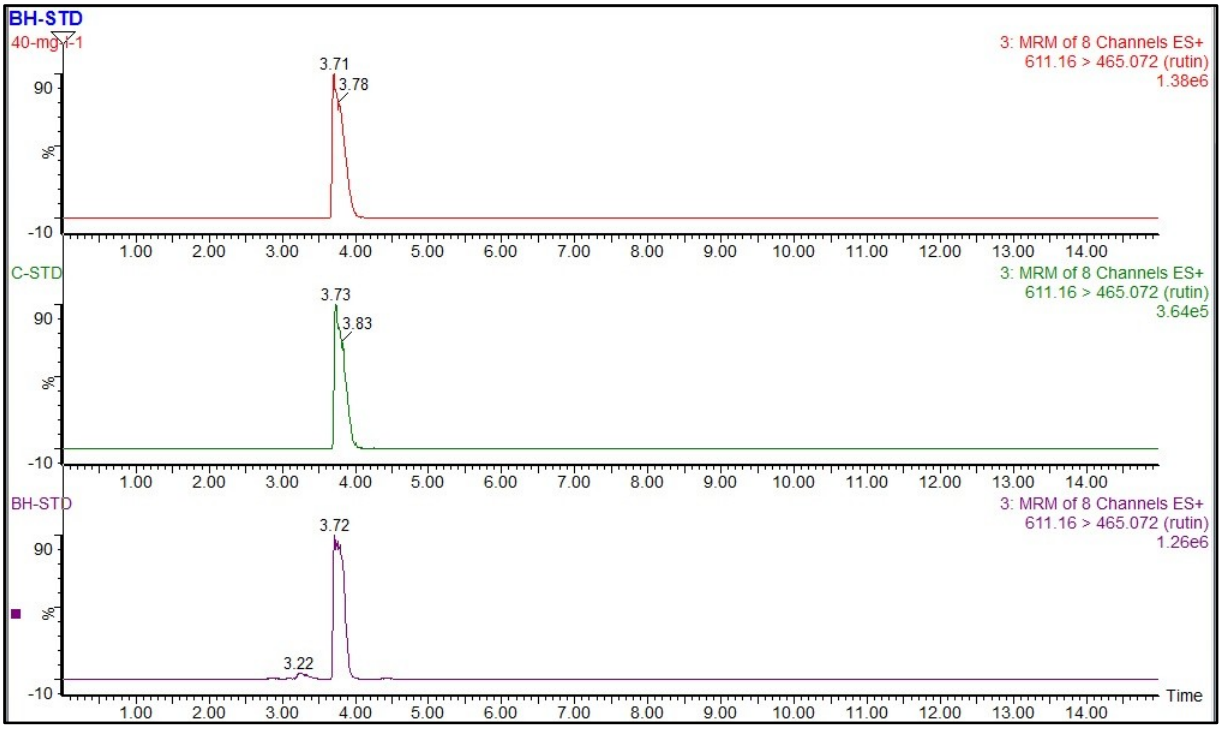
Quercetinmethylpentosylhexosy je posledním identifikovaným flavanoidem v našich vzorcích. Jeho přítomnost byla prokázána na základě měření přesných a správných hmotností v obou zkoumaných odrůdách. Na **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.** jsou znázorněny rekonstruované chromatogramy pro quercetinmethylpentosylhexosu a její fragmenty. Z obrázku je patrný společný pík s retenčním časem 3,60 min.. Quercetinmethylpentosylhexosy byl identifikován na základě interpretace MS spektra tohoto píku (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**). Tento flavanoid by mohl být také identifikován jako rutin (quercetin rutinosid). Důkladné prozkoumání symetrie píků a retenčních časů MRM přechodů standardu rutinu s našimi vzorky (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**) nedává jednoznačnou odpověď. Pro určení přesné struktury by bylo zapotřebí dalších měření dalšími technikami, například NMR.



Obr. 42 Porovnání rekonstruovaných chromatogramů pro vypočtenou teoretickou hmotnost quercetinu, quercetrutinhexosidu a quercetinmethylpentosylhexosid (z vrchu) ve vzorku odrůdy Blauhilde; (KE 5eV)



Obr. 43 MS spektrum píku s Rt: 3,6 min chromatogramu odrůdy Blauhilde se strukturami a vypočtenými hmotnostmi pro quercetin, quercetinhexosid a quercetinmethylpentosylhexosu (z leva); (KE 5eV)



Obr. 44 Porovnání MRM přechodů a jejich retenčních časů pro rutin v kalibračním roztoku s koncentrací 40 $mg \cdot l^{-1}$ nahoře a quercetimethylpentosylhexosy v extraktu kontrolního vzorku odrůdy Carmen uprostřed a extraktu kontrolního vzorku odrůdy Blauhilde dole; (KE 30eV)

4.2 Kvantifikace

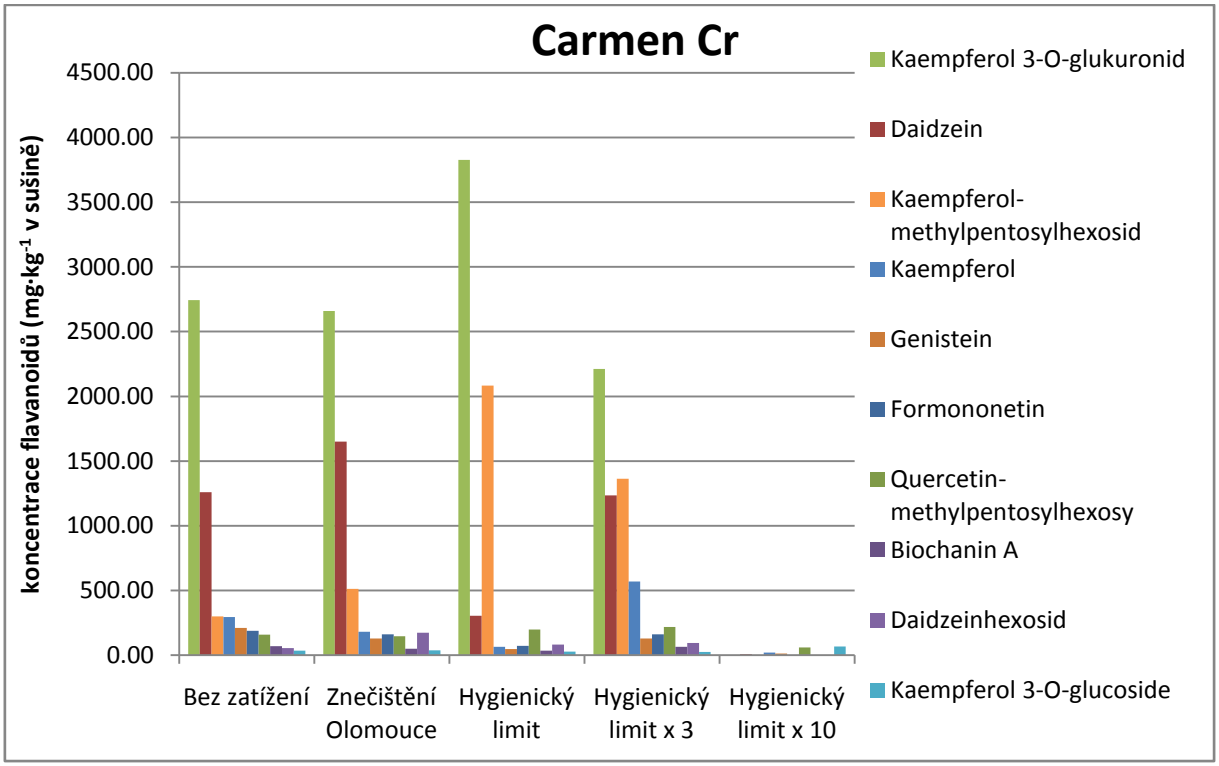
Všechny identifikované látky byly kvantifikovány. Výsledky byly shrnuty do tabulek podle příslušnosti k odrůdě rostliny a seřazeny na základě koncentrace v kontrolním vzorku od nejvyšší po nejnižší. Následně jsou porovnány a diskutovány vlivy jednotlivých těžkých kovů na obě rostliny.

4.2.1 Chróm

Chróm není pro rostliny biogenním prvkem, naopak je vysoce toxický pro většinu vyšších rostlin. I malé koncentrace chrómu v půdě mohou mít vliv na klíčení semen, růst kořene i nadzemních částí rostliny, schopnost kvést a na vývoj plodu. Chróm ovlivňuje fyziologické i metabolické procesy v rostlině, jako je vstřebávání a transport vody a minerálních látek, fotosyntézu, produkci a správné fungování enzymů a zapříčiňuje oxidativní stres.

Námi zkoumané odrůdy fazolu byly přesto schopny růst a přežít i v půdě s nejvyšší nastavenou koncentrací chrómu. Zvyšující se kontaminace měla vliv na produkci biomasy rostlinou. Odrůdy se od sebe výrazně lišily změnou profilu flavonoidů v závislosti na koncentraci chrómu v půdě. Z grafu na **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.** je patrné, že u odrůdy Blauhilde došlo k výraznému poklesu všech identifikovaných flavanoidů již při nejnižší zkoumané koncentraci kovu. Zvyšování kontaminace vedlo k dalšímu snižování obsahu flavonoidů v rostlině. Výjimku tvoří quercetinmethylpentosylhexosy, keampferolmethylpentosylhexosid, genistein a keampferol, u kterých došlo k výraznému úbytku koncentrace v reakci na kontaminaci odpovídající hygienickému limitu, následně k mírnému nárůstu při navýšení kontaminace na úroveň znečištění Olomouce a poté opět k poklesu (viz Tab. IV). Rostliny odrůdy Carmen reagovaly na zvyšující se koncentraci chrómu zvýšením produkce některých flavonoidů
(**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**, Tab. I). Vysoký obsah flavonoidů byl zjištěn i v rostlině zatížené trojnásobkem hygienického limitu, kde se koncentrace jednotlivých flavanoidů při porovnání s kontrolní rostlinou pohybovaly v rozmezí 61-455 %. Nejvyšší námi zkoumaná koncentrace chrómu vedla k výraznému poklesu všech identifikovaných flavonoidů.

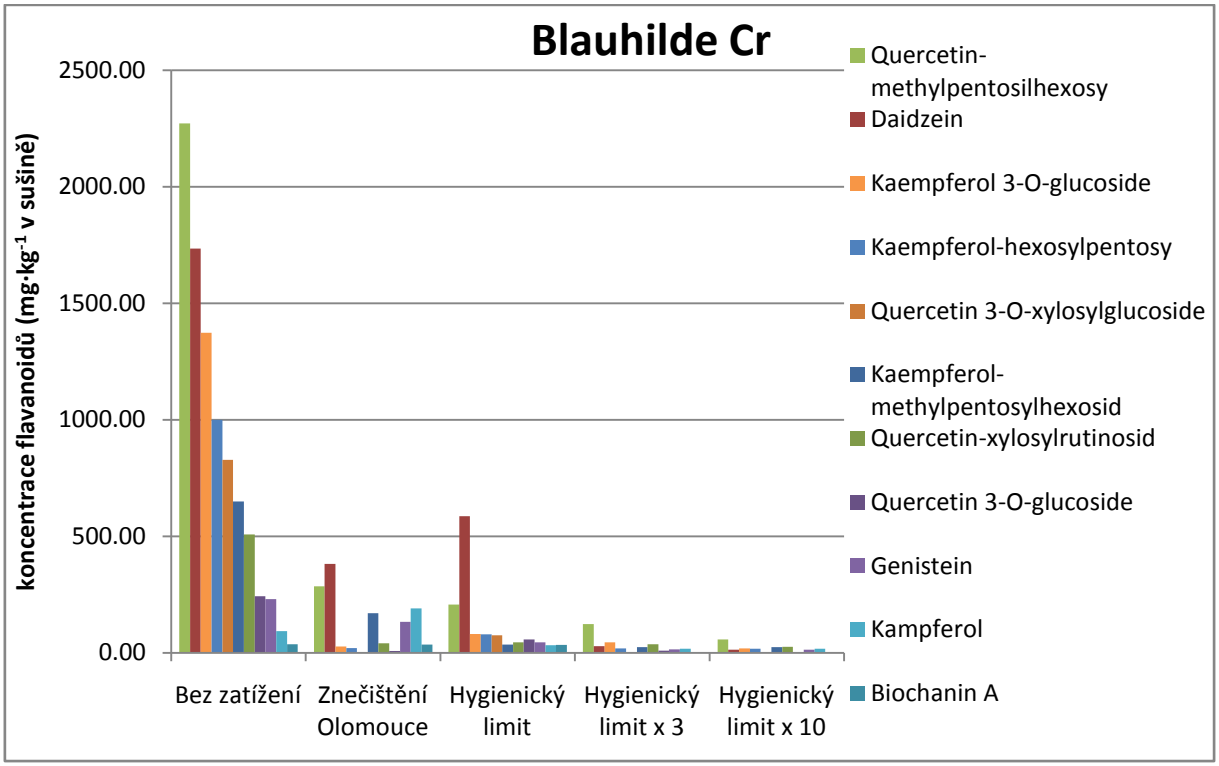
Námi dosažené výseldky korelují s prací Dr. Samantary a kol. z Regional Resource Center, Orissa v Indii. V této práci se autoři zabývali biochemickou odpovědí různých odrůd mungo fazolí, pěstovaných hydroponicky při různých koncentracích chrómu. Byl sledován vliv na klíčení semene, růst kořene, produkci chlorofylu a antioxidačních enzymů. Na základě těchto parametrů byly jednotlivé odrůdy mungo fazolí rozděleny na Cr-tolerantní a Cr-citlivé rostliny. Cr-tolerantní rostliny reagují na rostoucí koncentraci chrómu snižující se aktivitou antioxidačních enzymů, zatím co u Cr-citlivých rostlin dochází k nárůstu aktivity antioxidační enzymů. Tímto rozdílem by bylo možno vysvětlit rozdílné chování odrůdy Carmen a Blauhilde v naší studii[54].



Obr. 45 Graf vlivu koncentrační řady Cr na flavonoidy identifikované v odrůdě Carmen

Tab. III Koncentrace flavonoidů (mg·kg^{-1} sušiny) v odrůdě Carmen pro koncentrační řadu Cr

Flavanoid	Bez zatížení	Znečištění Olomouce	Hygienický limit	Hygienický limit x 3	Hygienický limit x 10
Kaempferol 3-O-glukuronid	2744.40	2660.33	3828.21	2210.65	0.00
Daidzein	1258.79	1649.17	304.43	1233.91	7.51
Kaempferol-methylpentosylhexosid	299.18	513.31	2083.65	1362.41	0.00
Kaempferol	295.21	180.53	64.16	569.98	19.23
Genistein	210.02	129.08	46.14	129.14	12.48
Formononetin	188.44	160.58	71.97	161.08	0.00
Quercetin-methylpentosylhexosy	158.65	145.47	198.89	216.88	59.06
Biochanin A	68.50	48.47	34.33	63.49	0.00
Daidzeinhexosid	54.47	173.00	82.70	94.12	0.00
Kaempferol 3-O-glucoside	34.72	37.95	27.80	25.47	66.85



Obr. 46 Graf vlivu koncentrační řady Cr na flavonoidy identifikované v odrůdě Blauhilde

Tab. IV Koncentrace flavonoidů (mg·kg^{-1} sušiny) v odrůdě Blauhilde pro koncentrační řadu Cr

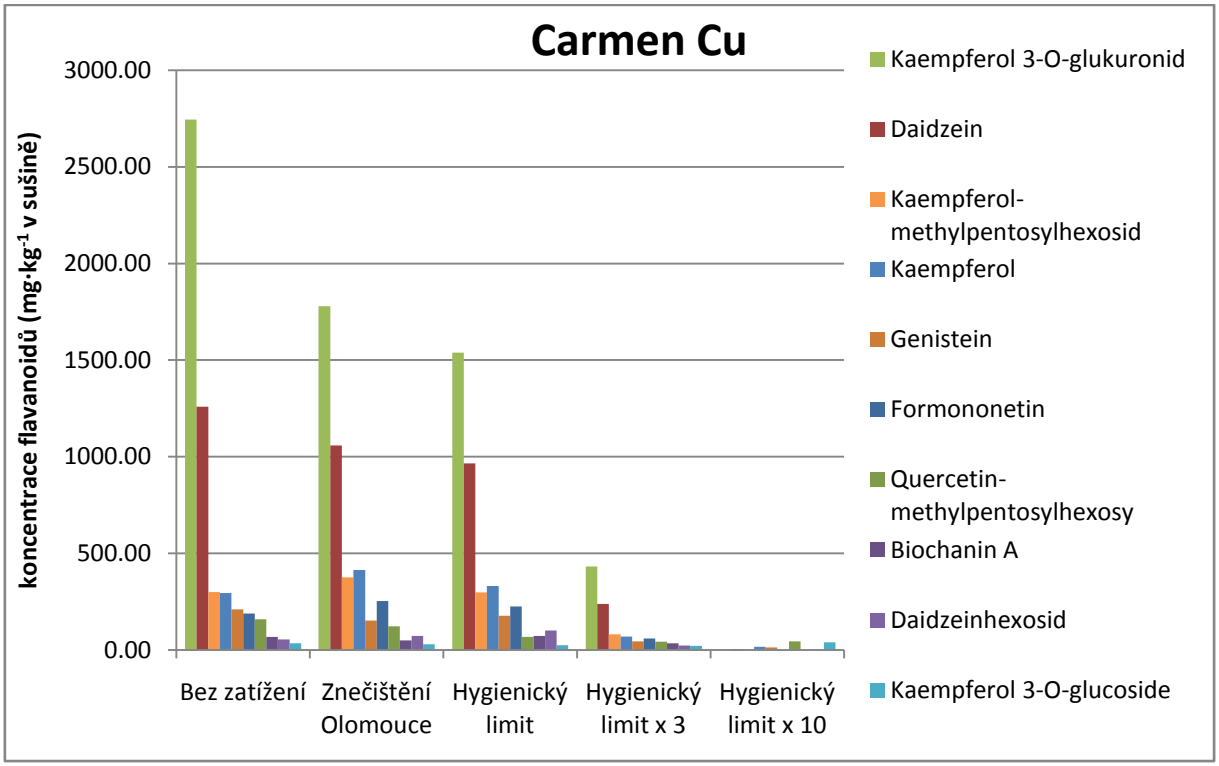
Flavanoid	Bez zatížení	Znečištění Olomouce	Hygienický limit	Hygienický limit x 3	Hygienický limit x 10
Quercetin-methylpentosilhexosy	2271.84	286.28	207.89	123.50	57.74
Daidzein	1734.91	381.89	587.07	28.75	14.41
Kaempferol 3-O-glucoside	1373.34	27.44	81.26	44.96	18.67
Kaempferol-hexosylpentosy	999.67	20.30	80.00	18.74	18.51
Quercetin 3-O-xylosylglucoside	828.97	0.00	75.06	0.00	0.00
Kaempferol-methylpentosylhexosid	649.18	170.64	35.55	25.10	24.84
Quercetinxylosylrutinosid	508.10	41.45	45.68	37.51	26.08
Quercetin 3-O-glucoside	242.78	8.66	57.14	9.44	0.00
Genistein	231.09	133.48	44.80	14.45	13.59
Kampferol	93.49	190.82	33.50	18.01	17.79
Biochanin A	36.88	36.35	34.71	0.00	0.00

4.2.2 Měď

Měď je jedním z nejdůležitějších stopových prvků ovlivňujících život rostlin. Je významnou součástí některých enzymů. Ve volné formě je pro rostliny toxická a to i při malých koncentracích. Negativně působí na klíčení semen, růst kořene, ovlivňuje vstřebávání a transport minerálních látek, fotosyntézu a metabolismus rostliny.

Námi studované odrůdy fazolu reagovaly na zvyšující se koncentraci mědi v půdě odlišným způsobem. U odrůdy Carmen došlo k pozvolnému úbytku téměř všech identifikovaných flavonoidů (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**, **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**Tab. V). Při aplikaci roztoku mědi odpovídající koncentračně desetinásobku hygienického limitu bylo pozorováno snížení koncentrace identifikovaných flavonoidů pod 5 % jejich koncentrace v porovnání s kontrolní rostlinou. Jak je vidět z grafu na **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**, odrůda Blauhilde reagovala prudkým poklesem všech flavonoidů již při nejnižší úrovni znečištění. Výjimku tvoří daidzein jehož koncentrace zprvu výrazně klesla, ale při maximální koncentraci opět narostla na množství odpovídající 31 % koncentrace v kontrolní rostlině.

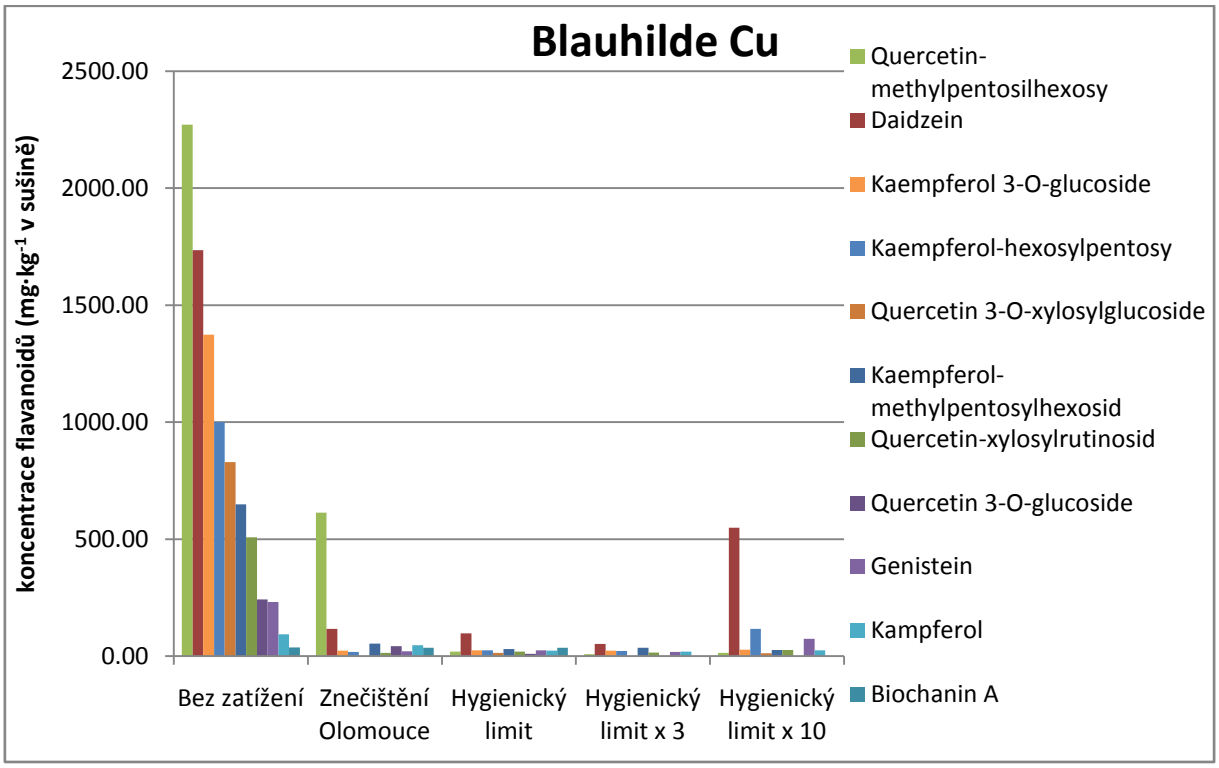
Vliv koncentrace mědi (a olova) na na rostlinu *Suaeda Heteroptera* (patřící do rodu rašelin) se věnovali na College of Marine Technology end Enviromental, Dalian Ocean University v Číně. V této studii byl sledován vliv na růst a vývoj rostliny a dále pak na aktivitu antioxidačních enzymů. Dosažené výsledky této studie kvalitativně korespondují s našimi poznatky. Bylo zjištěno, že i malá kontaminace mědi 50 $mg \cdot kg^{-1}$ půdy, může způsobit výrazný nárůst aktivity antioxidačních enzymů. Při narůstající koncentraci mědi (100, 200 a 400 $mg \cdot kg^{-1}$ půdy) se již mění aktivita antioxidačních enzymů je pozvolna[55].



Obr. 47 Graf vlivu koncentrační řady Cu na flavonoidy identifikované v odrůdě Carmen

Tab. V Koncentrace flavonoidů (mg·kg^{-1} sušiny) v odrůdě Carmen pro koncentrační řadu Cu

Flavanoid	Bez zatížení	Znečištění Olomouce	Hygienický limit	Hygienický limit x 3	Hygienický limit x 10
Kaempferol 3-O-glukuronid	2744.40	1778.56	1538.78	432.81	0.00
Daidzein	1258.79	1059.12	965.05	238.36	5.72
Kaempferol-methylpentosylhexosid	299.18	375.22	297.43	80.46	0.00
Kaempferol	295.21	413.48	330.63	70.28	17.31
Genistein	210.02	153.21	176.62	45.14	12.51
Formononetin	188.44	254.21	224.86	59.11	0.00
Quercetin-methylpentosylhexosy	158.65	121.89	68.49	43.07	45.30
Biochanin A	68.50	50.19	72.37	34.26	0.00
Daidzeinhexosid	54.47	72.29	100.71	23.83	0.00
Kaempferol 3-O-glucoside	34.72	30.46	24.05	21.43	39.14



Obr. 48 Graf vlivu koncentrační řady Cu na flavonoidy identifikované v odrůdě Blauhilde

Tab. VI Koncentrace flavonoidů (mg·kg^{-1} sušiny) v odrůdě Blauhilde pro koncentrační řadu Cu

Flavanoid	Bez zatížení	Znečištění Olomouce	Hygienický limit	Hygienický limit x 3	Hygienický limit x 10
Quercetin-methylpentosilhexosy	2271.84	613.36	19.25	8.83	13.27
Daidzein	1734.91	115.74	96.88	51.93	548.45
Kaempferol 3-O-glucoside	1373.34	23.30	24.56	22.89	27.86
Kaempferol-hexosylpentosy	999.67	18.25	24.19	22.00	116.66
Quercetin 3-O-xylosylglucoside	828.97	0.00	14.15	0.00	11.85
Kaempferol-methylpentosylhexosid	649.18	53.02	30.25	34.98	25.73
Quercetinxylosylrutinosid	508.10	14.13	19.63	15.00	26.03
Quercetin 3-O-glucoside	242.78	41.79	9.18	0.00	0.00
Genistein	231.09	20.62	24.67	17.58	73.39
Kampferol	93.49	46.17	23.19	19.04	24.46
Biochanin A	36.88	35.29	36.01	0.00	0.00

4.2.3 Nikl

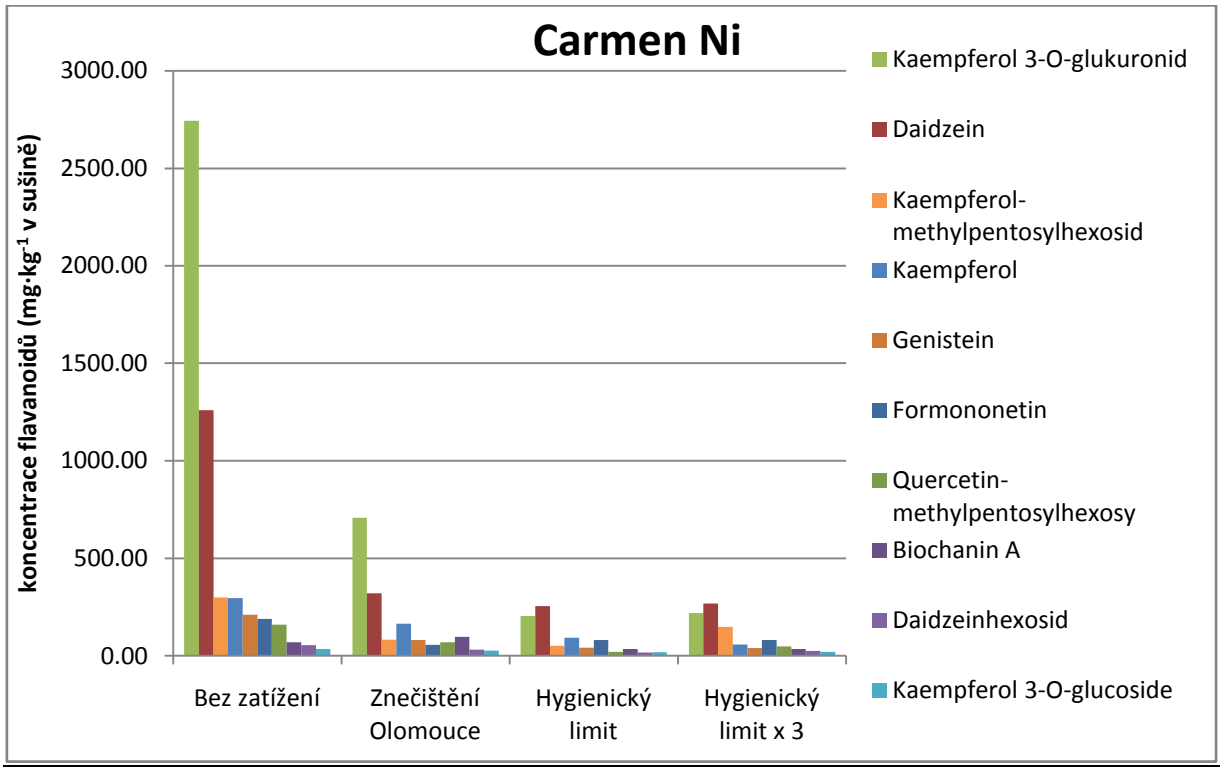
Nikl je pro rostliny rovněž významným stopovým prvkem a má vliv na mnoho metabolických procesů v rostlině. Je součástí důležitých enzymů, například ureázy. Je také důležitý pro správný vývoj embrya a tím pro úspěšné dokončení životního cyklu rostliny. Vyšší koncentrace niklu jsou však pro rostlinu toxické, dochází k metabolickému rozvratu a k inhibici některých enzymů, narušení syntézy proteinů a genotoxicitě. Vysoké koncentrace niklu mají také vliv na vstřebávání vody a minerálních látek kořenovým systémem, fotosyntézu a oxidativní stres.

Obě námi zkoumané odrůdy fazolu reagovaly na zvyšující se koncentraci niklu v půdě obdobně. Z grafů (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**, **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**) je vidět výrazné snížení obsahu flavonoidů oproti kontrolní rostlině při zatížení rostlin koncentrací odpovídající hygienickému limitu (zřejmě dochází k negativnímu ovlivnění metabolismu rostlin přítomností Ni, ale obaranná reakce rostliny ještě není doprovázena zvýšením produkce flavonoidů). Zátěž rostliny při aplikaci roztoku s koncentrací niklu

odpovídající znečištění Olomouce již způsobovala zvýšení produkce flavonoidů. Další významné zvýšení koncentrace niklu (na trojnásobek a desetinásobek hygienického limitu) již vede k poklesu koncentrace flavonoidů a úhynu rostlin.

Nárůst volných radikálů způsobený přítomností niklu, s tím spojený nárůst antioxidačních enzymůbyl pozorován i výzkumným týmem z Biosyntesis and Integrative Science Institute, Universidade do Porto v Portugalsku. V jejich práci byl studován vliv koncentrace niklu na růstové parametry lilku černého, dále pak změna koncentrace chlorofylu, obsah antioxidačních proteinů a enzymů, obsah volných radikálů a obsah bílkovin. Ačkoli v této práci nebyly přímo studovány změny v obsazích flavonoidů, lze předpokládat jejich aktivaci zvýšením koncentrace volných radikálů[54].

Vlivem niklu a zinku na antioxidační parametry sazenic kajanu indického se zabýval i RaoMandharova z Department of Botany, Andhara University v Indii. Byl pozorován nárůst aktivity antioxidačních enzymů s nárůstem koncentrace niklu v substrátu. Zároveň byl sledován i obsah kyseliny askorbové a glutathionu. Při zvyšující se koncentraci niklu docházelo k úbytku kyseliny askorbové i glutationu[56].

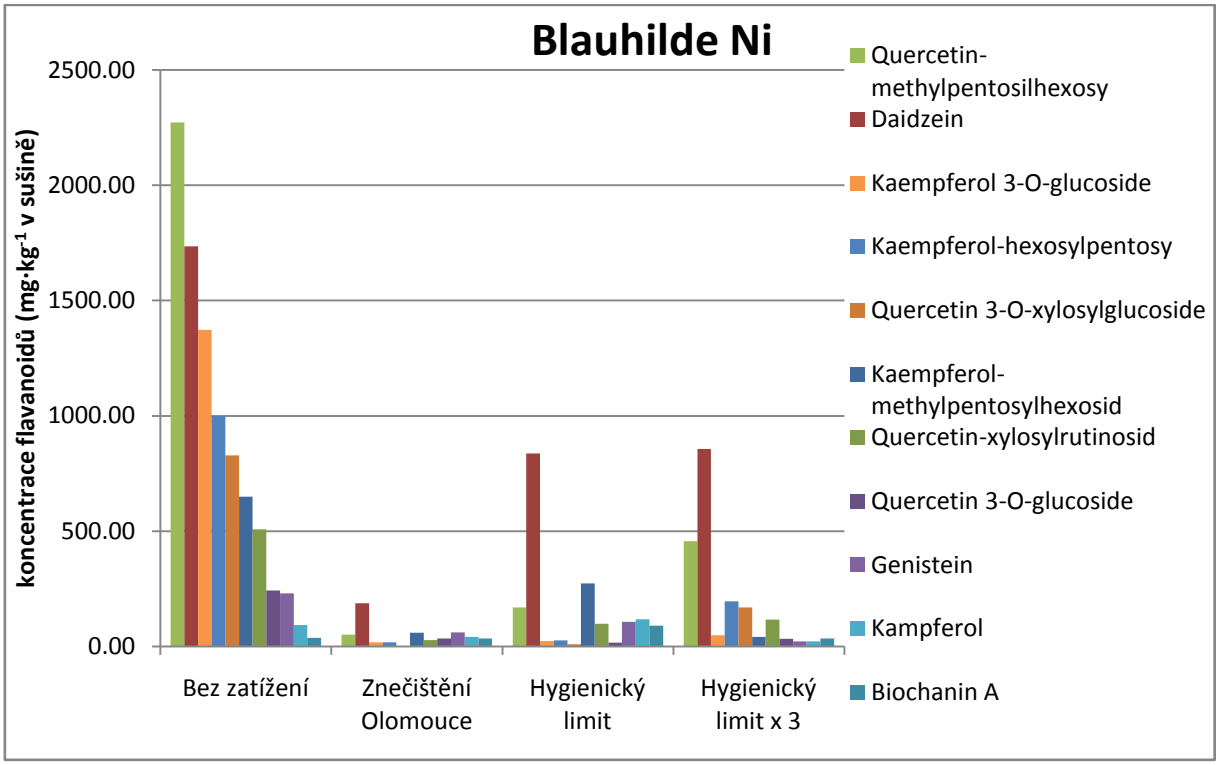


Obr. 49 Graf vlivu koncentrační řady Ni na flavonoidy identifikované v odrůdě Carmen

Tab. VII Koncentrace flavonoidů (mg·kg^{-1} sušiny) v odrůdě Carmen pro koncentrační řadu Ni

Flavanoid	Bez zatížení	Znečištění Olomouce	Hygienický limit	Hygienický limit x 3	Hygienický limit x 10
Kaempferol 3-O-glukuronid	2744.40	707.47	203.49	218.20	-
Daidzein	1258.79	319.61	254.24	267.67	-
Kaempferol-methylpentosylhexosid	299.18	82.30	50.57	148.44	-
Kaempferol	295.21	164.41	92.43	57.29	-
Genistein	210.02	79.91	40.44	39.75	-
Formononetin	188.44	55.23	80.54	80.10	-
Quercetin-methylpentosylhexosy	158.65	68.81	19.83	47.25	-
Biochanin A	68.50	96.49	35.09	34.56	-
Daidzeinhexosid	54.47	30.80	15.97	24.64	-
Kaempferol 3-O-glucoside	34.72	25.80	18.64	19.39	-

Prázdná místa v tabulce značí úhyn rostliny.



Obr. 50 Graf vlivu koncentrační řady Ni na flavonoidy identifikované v odrůdě Blauhilde

Tab. VIII Koncentrace flavonoidů (mg·kg^{-1} sušiny) v odrůdě Blauhilde pro koncentrační řadu Ni

Flavanoid	Bez zatížení	Znečištění Olomouce	Hygienický limit	Hygienický limit x 3	Hygienický limit x 10
Quercetin-methylpentosilhexosy	2271.84	51.28	169.84	456.53	-
Daidzein	1734.91	186.96	836.89	856.34	-
Kaempferol 3-O-glucoside	1373.34	18.22	23.63	48.59	-
Kaempferol-hexosylpentosy	999.69	17.63	25.96	196.24	-
Quercetin 3-O-xylosylglucoside	828.97	0.00	9.57	169.75	-
Kaempferol-methylpentosylhexosid	649.18	60.29	273.24	41.96	-
Quercetinxylosylrutinosid	508.10	27.22	98.23	117.28	-
Quercetin 3-O-glucoside	242.78	34.33	17.24	33.84	-
Genistein	231.09	60.60	107.38	21.96	-
Kampferol	93.49	42.30	118.07	21.84	-

Biochanin A	36.88	35.09	90.72	34.56	-

Prázdná místa v tabulce značí úhyn rostliny.

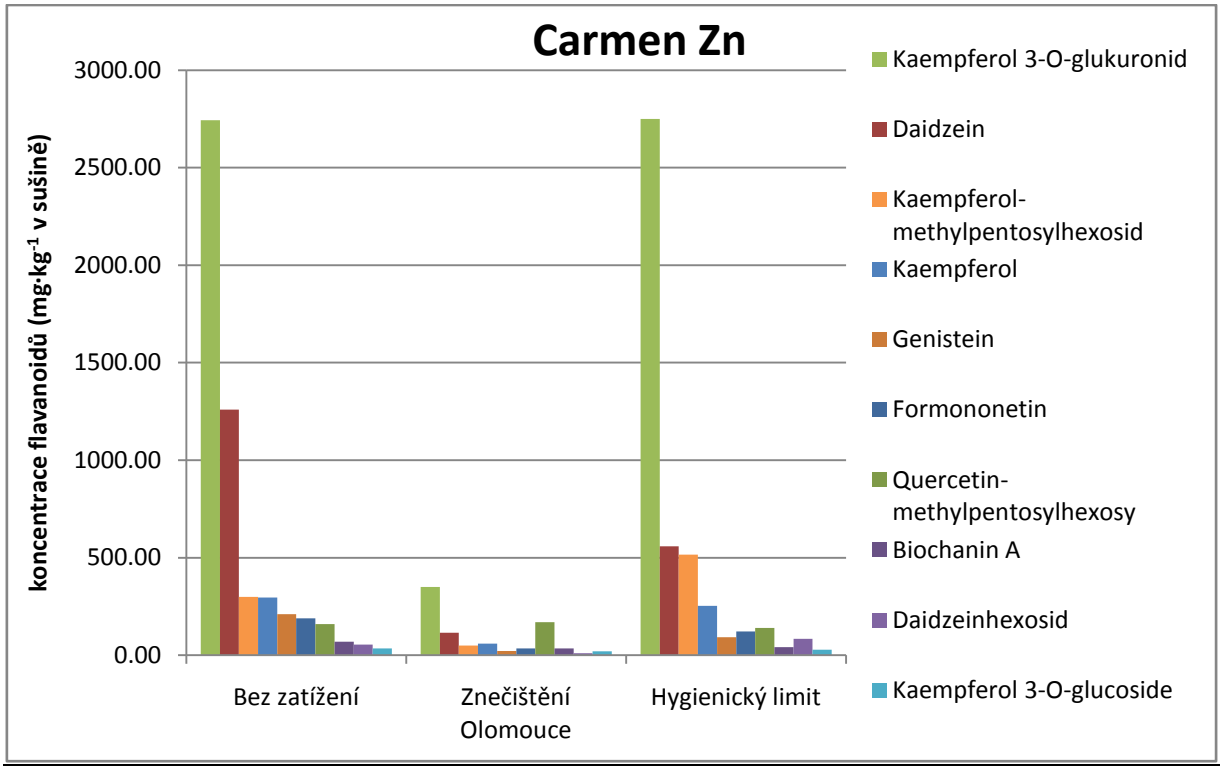
4.2.4 Zinek

Zinek je nezbytným prvkem pro správný růst a vývoj rostliny a je součástí mnoha rostlinných enzymů. Jeho nadměrná přítomnost v životním prostředí rostlinám ale škodí, podobně, jako je tomu i u dalších studovaných kovů. Kontaminace zinku, které překračují fyziologickou koncentraci, negativně ovlivňuje klíčení semen, vývoj kořene, zapříčiňuje úbytek biomasy rostliny a způsobuje chlorózu listů. Výrazně mění metabolické funkce buňky a ovlivňuje správnou funkci buněčné membrány, především pak její propustnost, což může vést až k usmrcení buňky.

V naší studii byl pozorován úbytek koncentrace flavonoidů při aplikaci roztoků zinku ve všech koncentracích. Vyšší koncentrace zinku vedou ke snížení koncentrace identifikovaných flavonoidů. Odrůda Carmen se ukázala být na přítomnost zinku citlivější (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**, **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**). Přestože na koncentraci odpovídající hygienickému limitu reagovala pozvolným úbytkem koncentrace flavanoidů, při kontaminaci odpovídající znečištění Olomouce byl úbytek flavanoidů mnohem výraznější a při koncentracích odpovídajících tří a desetinásobku hygienického limitu rostlina odumřela. Graf na **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.** poukazu je na pozvolný úbytek flavonoidů v odrůdě Blauhilde při zvyšující se koncentraci zinku v půdě, avšak ani tato odrůda nebyla životaschopná při koncentraci odpovídající desetinásobku hygienického limitu obsahu zinku v půdě. Daidzein a quercetinxylosylrutinosid reagovaly na zvyšující se koncentraci zinku v půdě odlišně. Jejich nejnižší koncentrace byly naměřeny ve vzorcích zatížených nejnižší kontaminací zinku.

Naše výsledky korespondují s výzkumem Michaela a kol. z Department of Bioenergy, Maduria Kamaraj University v Indii. V jeho práci byl sledován vliv nadlimitní koncentrace zinku na antioxidační aktivitu semenáčů fazolu. Sledovanými parametry byly růst rostliny, permeabilita buněčných membrán, obsah antioxidačních enzymů a obsah prolinu a kyseliny askorbové, které mají rovněž antioxidační účinky. Se zvyšující se koncentrací zinku byl pozorován nárůst aktivity antioxidačních enzymů a zároveň pokles obsahu antioxidantů. Podobných výsledků bylo dosaženo i v případě studie vlivu zinku a niklu na antioxidační parametry sazenic kajanu indického, kde taktéž docházelo k nárůstu aktivity antioxidačních

enzymů a zároveň k úbytku kyseliny askorbové a glutationu, jakožto antioxidantů. V porovnání s niklem byla odezva rostlin na zvyšující se koncentraci zinku pozvolnější.



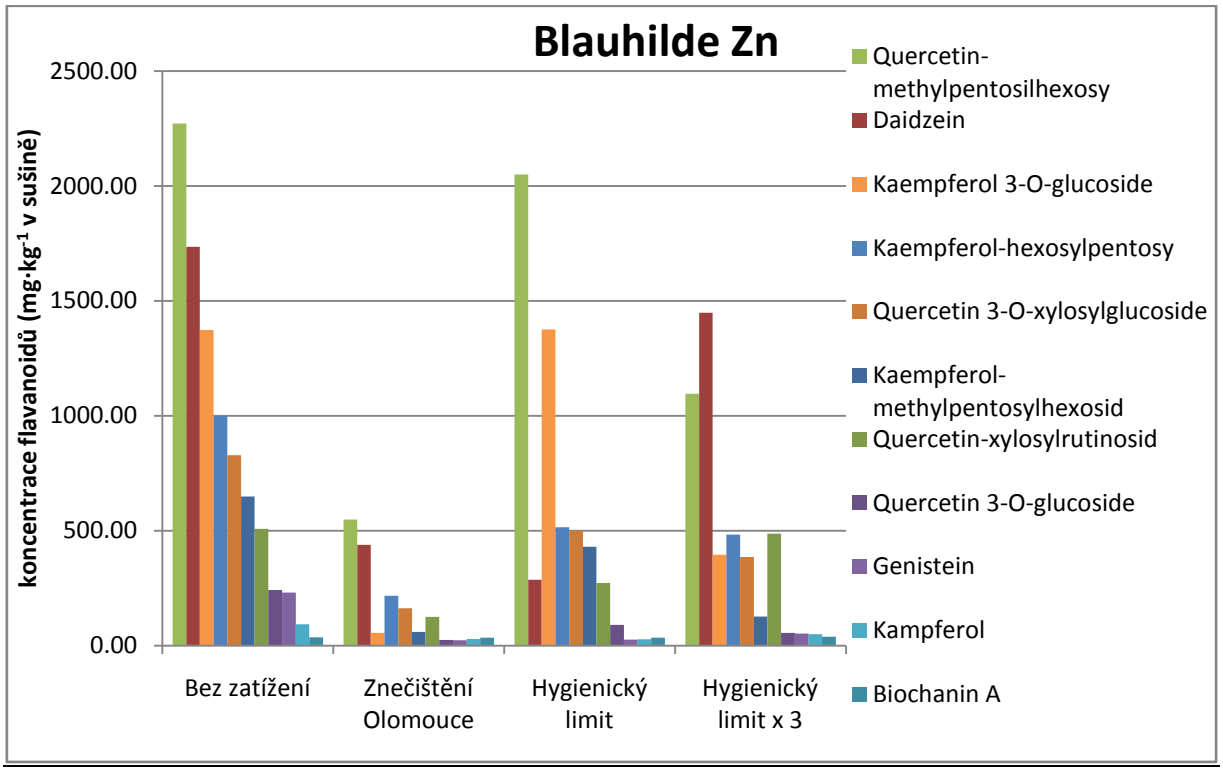
Obr. 51 Graf vlivu koncentrační řady Zn na flavonoidy identifikované v odrůdě Carmen

Tab. IX Koncentrace flavonoidů (mg·kg^{-1} sušiny) v odrůdě Carmen pro koncentrační řadu Zn

Flavanoid	Bez zatížení	Znečištění Olomouce	Hygienický limit	Hygienický limit x 3	Hygienický limit x 10
Kaempferol 3-O-glukuronid	2744.40	349.22	2750.66	-	-
Daidzein	1258.79	115.74	558.67	-	-
Kaempferol-methylpentosylhexosid	299.18	48.89	514.87	-	-
Kaempferol	295.21	59.05	253.10	-	-
Genistein	210.02	20.89	91.49	-	-
Formononetin	188.44	34.37	121.01	-	-
Quercetin-methylpentosylhexosy	158.65	169.43	140.26	-	-
Biochanin A	68.50	35.29	40.96	-	-

Daidzeinhexosid	54.47	10.56	83.32	-	-
Kaempferol 3-O-glucoside	34.72	19.70	27.54	-	-

Prázdná místa v tabulce značí uhynulé rostliny.



Obr. 52 Graf vlivu koncentrační řady Zn na flavonoidy identifikované v odrůdě Blauhilde

Tab. X Koncentrace flavonoidů (mg·kg^{-1} sušiny) v odrůdě Blauhilde pro koncentrační řadu Zn

Flavanoid	Bez zatížení	Znečištění Olomouce	Hygienický limit	Hygienický limit x 3	Hygienický limit x 10
Quercetin-methylpentosilhexosy	2271.84	548.14	2049.88	1095.99	-
Daidzein	1734.91	438.63	287.51	1448.91	-
Kaempferol 3-O-glucoside	1373.34	55.97	1376.21	395.41	-
Kaempferol-hexosylpentosy	999.67	217.69	515.94	483.09	-
Quercetin 3-O-xylosylglucoside	828.97	163.34	499.78	385.12	-
Kaempferol-methylpentosylhexosid	649.18	59.83	430.26	126.31	-

Quercetinxylosylrutinosid	508.10	125.50	272.63	488.09	-
Quercetin 3-O-glucoside	242.78	25.16	90.23	55.39	-
Genistein	231.09	23.82	26.70	53.11	-
Kampferol	93.49	28.95	27.25	50.25	-
Biochanin A	36.88	34.89	34.50	39.03	-

Prázdná místa v tabulce značí úhyn rostliny.

5 Závěr

Analýzou složení extraktů listů fazolu metodou kapalinové chromatografie a tandemové hmotnostní spektrometrie se nám podařilo identifikovat a kvantifikovat následující flavonoidy: Biochanin A, Daidzein, Daidzeinhexosid, Formononetin, Genistein, Kaempferol, Kaempferol 3-O-(malonyl)glucoside, Kaempferol 3-O-glukuronid, Kaempferol-methylpentosylhexosid a Quercetin-methylpentosylhexosy v odrůdě Carmen. Dále pak Biochanin A, Daidzein, Genistein, Kaempferol 3-O-(malonyl)glucoside, Kaempferol-hexosylpentosy, Kaempferol-methylpentosylhexosid, Kampferol, Quercetin 3-O-glucoside, Quercetin 3-O-xylosylglucoside, Quercetin-methylpentosilhexosy, Quercetin-xylosylrutinosid v odrůdě Blauhilde. Zkoumané rostliny byly v průběhu svého života zalévány vodnými roztoky těžkých kovů o různé koncentraci. Kvantifikace identifikovaných flavonoidů v jednotlivých vzorcích nám umožnila porovnat vliv podmínek pěstování na rostliny a také rostliny mezi sebou. Dosažené výsledky ukazují, že na zvyšující se koncentraci zinku a niklu v půdě reagují obě námi zkoumané odrůdy stejně. U kontaminace půdy mědí, nebo chrómem je tomu jinak. Zatímco u odrůdy Carmen dochází k nárůstu obsahu flavonoidů, u odrůdy Blauhilde dochází k prudkému úbytku všech flavonoidů již při nízkých koncentracích.

Tato studie je v současné době jediná, která se zabývá vlivem těžkých kovů na obsah flavonoidů v rostlinách. Dostupná literatura se věnuje spíše vlivu těžkých kovů na aktivitu antioxidačních enzymů. Předmětem dalšího výzkumu v této oblasti by mohl být vliv směsi těžkých kovů na obsah flavonoidů v rostlině a to především proto, že zemědělské půdy jsou častěji kontaminovány více než jedním těžkým kovem.

6 Literatura

1. Adriano D.: *Trace elements in the terrestrial enviromental*, New York, 1986.

2. Macková M.: *Využití rostlin k eliminaci xenobiotik z životního prostředí*, dostupné z http://www.phytosanitry.org
3. Grateo P., Polle A.: *Functional Plant Biology*. 6, 81-94 (2005)
4. Singh H., Batish D.: *Plant Grow Regulation*. 53, 65-73 (2007)
5. Küpper H., Andersen E.: *Metallomics*. 8, 269-285 (2016).
6. Houba M*, Luskoviny pěstování a už*ití 1., České Budějovice, 2009.
7. Strosserová A.: *Výživa a potraviny*. 5, 56-67 (2009).
8. Prugar J.: *Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí.* Praha (2008)
9. Broughton W.J.: *Plant and Soil*. 252, 55-128 (2003)
10. Huma N.: *Nutrition & Food Science*. 38, 570-577 (2008)
11. Aune D.: *Cancer Couse Control*. 20, 1605-1615 (2009)
12. Dang J., Arcot J.: *Food Chemistry*. 68, 295-298 (2000)
13. Messina M.J.: *The American Journal of clinical nutrion*. 70, 439-450 (1999)
14. Rochfort S., Panozzo J.: *Journal of Agricultural & Food Chemistry*. 55, 81-94 (2007)
15. Slanina J., Táborská E.: *Chemické listy*. 98, 239-245 (2004).
16. Winkel-Shirley B.: *Flavonoid Biosynthesis. Plant Physiology*. 126, 485-493 (2001).
17. Su S.J., Yeh Y.T., Shyu H.W.,: J. *Evidence-Based Complementary Altern*. Med. 2013, 1-10 (2013).
18. Szliszka E., Czuba Z. P., Mertas A., Paradysz A., Krol W.,: *Urologic Oncology*. 31, 331–342 (2013).
19. Chundi V., Challa S. R., Garikapati D. R., Juvva G., Jampani A., Pinnamaneni S. H., Venigalla S. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*. 2016, 1-7 (2016).
20. Wang J., He C., Wu W.Y., Chen F., Wu Y.Y., Li W. Z., Chen H. Q., Yin Y. Y.: *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 138, 96-103 (2015)
21. Zeng H., Wang Y.: *International Journale of Biological Macromolecules*. 89, 336-343 (2016)
22. Mutai P., Pavadai E., Wiid I., Ngwane A., Baker B., Chibale K.: *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 25, 2510-2513 (2015).
23. Sureda A., *Chemico-Biological Interactions*. 268, 37-46 (2017)
24. Peng X. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 204, 16-25 (2015)
25. Wu Ch., Shieh TM.: *Journal of Functional Food*. 19, 495-504 (2015)
26. D´Andrea G.: *Fitoterapia*. 106, 256-271 (2015)
27. Sghaier M.: *Biological & Pharmacoloteraphy*. 84, 1972-1978 (2016)

28. Romanik G., Gilgenast E., Przyjazny A., Kamński M.: *Journal of Biochemical and Biopshysical Methods*. 70, 253-261 (2007).
29. Robbins R. J.: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51, 2866-2887 (2003).
30. Huie C. W.: *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 373, 23-30 (2002)
31. Rijke D. E., Out P., Niessen W. M. A., Ariese F., Gooijer C., Brinkman U.: *Journal of Chromatography A*. 1112, 31-63 (2006).
32. Olariu R. I., Vione D., Grinberg N., Arsene C.: Journal *of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 33, 1174-1207 (2010).
33. Ajila C. M., Brar S. K., Verma M., Tyagi R. D., Godbout S., Valéro J. R.: *Critical Reviews in Biotechnology*. 2010, 1-22 (2010).
34. Stalikas C. D.: *Journal of Separation Science*. 30, 3268-3295 (2007).
35. Richter B. E., Jones B. A., Ezzel J. L., Porter N. L.: *Analytical Chemistry*. 68, 1033-1039 (1996).
36. Camel V.: *The Analyst.* 126, 1182-1193 (2001)
37. Teo Ch. Ch., Tan N. S., Yong H. W. J., Hew S. Ch., Ong E. S.: *Journal of Chromatography A*. 1217, 2484-2494 (2010).
38. Klejdus B., Kopecký J., Benešová L., Vacek J.: *Journal of Chromatography A*. 1216, 763-771 (2009).
39. Herrero M., Cifuentes A., Ibanez E.: *Food Chemistry*. 98, 136-148 (2006).
40. Chen L., Jin H., Ding L., Zhang H., Li J., Qu Ch., Zhang H.: *Separation and Purification Technology*. 59, 50-57 (2008).
41. Both S., Chemat F., Strube J.: *Ultrasonics Sonochemistry*. 21, 1030-1034 (2014).
42. Olariu R. I., Vione D., Grinberg N., Arsene C.: *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 33, 1174-1207 (2010).
43. Wang N., Huang X., Wang X., Zhang X, Wu R., Shou D.: *Journal of Chromatography B*. 990, 64-72 (2015).
44. Rijke D. E., Out P., Niessen W. M. A., Ariese F., Gooijer C., Brinkman U.: *Journal of Chromatography A*. 1112, 31-63 (2006).
45. Stalikas C. D.: *Journal of Separation Science*. 30, 3268-3295 (2007)
46. Dvořáková M., Dostálek P., Hulín P.: *Kvasný průmysl*. 52, 111-114 (2006).
47. Gil E. S., Couto R. O.: *Brasilian Journal of Pharmacognosy*. 23(3), 543-558 (2013)
48. Samantary S.: *Chemosphere*. 47, 1065-1072 (2002).

49. Robbins R. J.: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51, 2866-2887 (2003).
50. Jurgen M.:*Journal fo Chromatography A*. 195, 85-94 (1980).
51. Lee B. L., Ong Ch. N.: *Journal of Chromatography A*. 881, 439-447 (2000).
52. Stofferová E.: *Jsou těžké kovy pro suchozemské stejnonožce zátěží? Demekologická studie z prostředí města Olomouce*. Diplomová práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2009
53. Lin L. Z., Harnly J. M., Pastor-Corrales M. S., Luthria D. L.: *Food Chemistry*. 107, 399-410 (2008).
54. Samantary S.: Chemosphere. 47, 1065-1072 (2002).
55. He J., Ji Z. X., Wang Q. Z., Liu Ch. F., Zhou Y. B.: *Ecological Engineering*. 87, 102-109 (2016).
56. Amari T., Ghnaya T., Abdelly C.: *South African Journal of Botany*. 111, 99-110 (2017).

7 Seznam zkratek

CE – kapilární elektroforéza

EOF – elektroosmotický tlak

GC – plynová chromatografie

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

LLE – extrakce kapalina/kapalina

MAE – mikrovlnná extrakce

MS – hotnostní spektrometrie

MSPD – extrakce disperzní tuhou fází

PLE – extrakce za zýšeného tlaku

SFE – superfluidní extrakce

SLE – extrakce pevná látka-kapalina

SPE – extrakce na tuhé fázy

SPME mikroextrakce na tuhé fázy

TLC – chromatografie na tenké vrstvě

UHPLC – ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie