

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

**Fakulta přírodovědecká
Katedra analytické chemie**



**UNIVERZITA
PALACKÉHO
V OLOMOUCI**

**STANOVENÍ CHALKONOVÉHO BARVIVA HYDROXYSAFFLOR
YELLOW A METODOU HPLC/MS**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor práce:

Stloukalová Kateřina

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí diplomové práce:

RNDr. Fryčák Petr, Ph.D.

OLOMOUC 2012

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

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

V Olomouci dne

.....

Vlastnoruční podpis

Poděkování

Chtěla bych poděkovat vedoucímu své bakalářské práce RNDr. Petru Fryčákovi, Ph.D. za odborné vedení při řešení této problematiky, cenné rady, trpělivost a čas, který mi věnoval při zpracovávání této práce. Dále bych chtěla poděkovat studentu analytické chemie Bc.Vítězslavovi Brandovi za rady a pomoc při měření. A v neposlední řadě své rodině za psychickou podporu.

Souhrn

Tato bakalářská práce se zabývá stanovením žlutého barviva hydroxysafflor yellow A v květech světlice barvířské. Světlice barvířská (*Carthamus tinctorius*) je kulturní plodina, která pochází z Přední Persie. Dříve se pěstovala pro své barvířské schopnosti. Barvily se jí látky na červeno, protože její květy obsahují kromě žlutého barviva hydroxysafflor yellow A i červené barvivo carthamin. V dnešní době je tato rostlina známá především pro svůj vysoce kvalitní olej, který se lisuje z jejich semen. V tradiční čínské medicíně se používá hydroxysafflor yellow A pro své léčebné účinky především na srdce a játra. Dále ho tato medicína doporučuje na srdečně-cévní systém, mírně stimuluje srdce, snižuje odpor věnčitých tepen, zlepšuje krevní oběh a průtok zejména u srdečního svalu. Poskytuje výživu srdečního svalu, zabraňuje srážení krevních destiček a tím zabraňuje tvorbě trombózy, malé množství může zvýšit rytmické kontrakce dělohy těhotné; naopak velké množství může způsobit sevření až křeče. Hydroxysafflor yellow A poskytuje ochranu pro mozek v případě nedostatku kyslíku a má antibakteriální, protiplísňové a analgetické účinky. Používá se jako diuretikum, při střevních problémech, revmatoidní artritidě, onemocnění spalničkami, onemocnění průdušek a horních cest dýchacích, některých nádorových onemocněních a při poruchách menstruace. Klasická medicína využívá léčebných účinků hydroxysafflor yellow A při neurologických problémech a při léčbě srdečních chorob. V klasické medicíně se využívá ochranného účinku hydroxysafflor yellow A v případě reperfuse po ischemické příhodě, dále jeho neuroprotektivních účinků a při léčbě kardiovaskulárních chorob.

Cílem práce bylo vytvořit citlivou metodu pro kvantifikaci tohoto barviva. K řešení této problematiky jsme použili spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie s hybridním analyzátozem Q-TOF. Vedle citlivé metody byla nalezena i vhodná mobilní fáze a eluční gradient pro účinnou separaci. Pracovalo se metodou kalibrační křivky, která byla sestavená z roztoků o různých koncentracích připravených ze standardu hydroxysafflor yellow A.

Barvivo bylo stanovováno ve vysušených květech světlice barvířské, kde bylo stanoveno 1,9 % (m/m). Součástí této práce byla i aplikace vyvinuté metody na produkt, který obsahoval barvivo hydroxysafflor yellow A a byl běžně dostupný na našem trhu. Pro toto stanovení byl vybrán dětský instantní nápoj Sunárek s pomerančovou příchutí a JOJO

bonbóny ABECEDA, kde bylo barvivo součástí žlutých bonbónů. Množství HSYA odpovídalo obsahu 22 ppm v Sunárku a 17 ppm v JOJO bonbónech.

OBSAH

1.	ÚVOD.....	1
2.	TEORETICKÁ ČÁST	2
2.1	Polyfenoly.....	2
2.1.1	Struktura fenolových sloučenin.....	4
2.1.2	Jednoduché fenoly a flavonoidy.....	7
2.1.3	Taniny.....	9
2.1.3.1	Hydrolyzovatelné taniny.....	9
2.1.3.2	Kondenzované taniny.....	10
2.1.4	Polyfenoly v potravě.....	11
2.1.4.1	Obah polyfenolických látek v některých potravinách a nápojích.....	11
2.1.4.2	Příklady potravin bohatých na polyfenoly.....	12
2.1.5	Biologická dostupnost polyfenolických látek.....	13
2.1.6	Metabolismus polyfenolických látek.....	13
2.1.7	Fermentace polyfenolických sloučenin.....	15
2.1.8	Antioxidační aktivita polyfenolů v potravinách.....	16
2.2	Světlice barvířská (Carthamus tinctorius).....	20
2.2.1	Původ a rozšíření.....	20
2.2.2	Botanická charakteristika.....	20
2.2.3	Využití produktu.....	22
2.3	Carthamin.....	24
2.4	Hydroxysafflor yellow A.....	25
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	27
3.1	Použité chemikálie.....	27
3.2	Vzorky.....	27
3.3	Instrumentace a metody.....	27
4.	VÝSLEDKY A DISKUSE	31
4.1	Opakovatelnost a reprodukovatelnost.....	32
4.2	Mez detekce a stanovitelnosti.....	33
4.3	Kalibrační křivka.....	34
4.3.1	Stanovení koncentrace HSYA v Sunárku.....	34
4.3.2	Stanovení obsahu HSYA ve žvýkacích bonbónech JOJO ABECEDA.....	36

4.3.3	Stanovení koncentrace HSYA ve vysušených květech světlice barvířské.....	38
4.4	Kolizní indukovaná disociace hydroxysafflor yellow A.....	40
4.5	Srovnání vyvinuté metody s metodami popsányými v literatuře.....	43
5.	ZÁVĚR.....	44
6.	LITERARURA.....	45
7.	SEZNAM PUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	52
	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	53
	SEZNAM TABULEK.....	5

1. ÚVOD

Polyfenoly tvoří širokou skupinu látek, která má zastoupení téměř ve všech rostlinách. Člověk se s nimi setkává denně aniž by o tom věděl. Polyfenolické látky plní důležité role v rostlinném těle a pro obyvatelstvo představují potraviny bohaté na polyfenoly rozsáhlé zdroje antioxidantů. V současné společnosti zatížené mnoha nemocemi, které mají negativní dopad na kvalitu života se proto polyfenoly stávají stále častěji předmětem četných studií. Polyfenoly mají pozitivní účinky na lidské zdraví a jejich příjmem přispíváme k prevenci před mnoha nemocemi jako jsou například kardiovaskulární onemocnění a další patologické stavy. Proto by jídelníček dnešní populace měl být bohatý na zeleninu a ovoce, kde jsou široce zastoupeny polyfenolické sloučeniny. Další významnou vlastností této skupiny látek je vystupování v roli přírodních barviv, které bývají často nahrazovány syntetickými aditivy.

Tato bakalářská práce se zaměřuje na hydroxysafflor yellow A (HSYA) polyfenolové žluté barvivo obsažené v květech světlíce barvířské (*Carthamus tinctorius*). Světlíce barvířská je kulturní plodina, která pochází z Přední Asie a v dávných dobách se využívalo především jejich barvířských a léčivých vlastností. V dnešní době se světlíce pěstuje především pro svá semena z kterých se lisuje jeden z nejkvalitnějších olejů vůbec. Ale neupustilo se ani od jejich barvířských schopností, kterých se využívá především pro dobarvování potravin. Hydroxysafflor yellow A se používá jak v tradiční čínské medicíně, tak i v klasické medicíně. Využívá se především při léčbě kardiovaskulárních onemocnění a jeho protinádorových a neuroprotektivních účinků.

Součástí této práce je kvantifikace HSYA ve vysušených květech světlíce barvířské, v dětském instantním nápoji s pomerančovou příchutí Sunárku a JOJO bonbónech ABECEDA. Pro měření jsme zvolili spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostního spektrometru s hybridním analyzátozem Q-TOF. Pro stanovení HSYA byla vyvinuta metoda založená na rychlé chromatografické separaci v délce 3,5 minuty.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Polyfenoly

Nedílnou součástí lidské i zvířecí stravy představuje jedna z nejpůsobivějších a všudypřítomných skupin rostlinných metabolitů, která se nazývá polyfenoly. Tato skupina, která je velmi složitá, se vyskytuje v rostlinné potravě ve strukturně pestrých formách od jednoduchých fenolických molekul až po vysoce polymerizované sloučeniny s molekulovou hmotností vyšší než 30000 Da.¹

Pojem polyfenoly může být vysvětlen různými definicemi:

- Termín „polyfenoly“ může být použit k definici sekundárních rostlinných metabolitů pocházejících z šikimátové cesty propanolů nebo z polyketidové cesty. Polyfenoly obsahují více než jeden fenolický kruh a ve své základní struktuře neobsahují žádnou dusíkatou funkční skupinu.²
- Termín polyfenoly se může použít pro popis vodou-rozpustných rostlinných fenolických látek, které mají molekulární hmotnost v rozmezí od 500 do 3000–4000 Da a obsahují 12–16 fenolových hydroxylových skupin na pět až sedm aromatických kruhů, které mají molární molekulovou hmotnost okolo 1000 Da. Navíc tyto sloučeniny podléhají obvyklým fenolickým reakcím a mají schopnost vysrážet z roztoku některé alkaloidy, želatiny a jiné proteiny.³
- Termín „polyfenoly“ je z chemického hlediska striktně omezen na sloučeniny, které ve své struktuře obsahují nejméně dvě fenolové skupiny, bez ohledu na to kolik hydroxylových skupin je na každý cyklus navázáno.⁴

Polyfenoly patří do velké skupiny chemických sloučenin nazývané fenolické látky a jsou široce rozšířeny ve většině rostlin, kde plní různé funkce. Do lidského těla se dostávají ve stravě bohaté na zeleninu a ovoce. V lidském těle mají polyfenoly nejrůznější biologické účinky, avšak jejich nejdůležitější role spočívá v jejich antioxidačních účincích.⁵

Až do nedávné doby se většina studií soustředila na polyfenolické sloučeniny v potravě zejména pro jejich škodlivé účinky způsobené schopností některých polyfenolů vázat a vysrážet makromolekuly, jako jsou nízkokalorické bílkoviny, sacharidy a trávicí enzymy, čímž se sníží stravitelnost potravy.⁵ Taniny mají nepříznivý účinek na stravitelnost bílkovin a proto byly polyfenoly považovány za nevyživné. Zvýšený zájem o fenoly obsažené v jídle se odvíjí od jejich antioxidační kapacity (likvidují volné radikály a mají chelatační účinky na kovové ionty) a s tím souvisejícími pozitivní účinky na lidské zdraví, jako je například snížení

rizika výskytu rakoviny a její léčby, kardiovaskulárních onemocnění a dalších patologických stavů.¹

Největší zájem vědců přitahují polyfenoly, které jsou nezbytnou součástí fyziologie rostlin, kde jsou obsaženy ve všech rostlinných částech, protože přispívají k jejich morfologii (morfologie rostlin je botanický obor, který studuje vnější stavbu rostlinného těla). Polyfenolické sloučeniny (např. lignin apod.) jsou zde zapojeny do růstu a pigmentace rostliny a zajišťují jí odolnost vůči patogenům a býložravcům, buď tím že působí jako fytoalexiny (Fytoalexiny jsou antimirobiální látky syntetizované rostlinami de novo. Působí jako širokospektrální inhibitory a dochází k jejich rychlému hromadění v místě infekce patogeny. Z chemického hlediska mají rozmanitou strukturu typickou pro daný rostlinný druh), nebo tím, že zvýší hořkost rostlin, které jsou poté nepoživatelné.¹

Pigmentace probíhá pomocí aromatických kruhů, které musí splňovat podmínku přítomnosti dvou hydroxylových skupin ve vicinální poloze. Tyto dvě hydroxylové skupiny působí jako chelatační činidlo pro kovový ion. Tímto procesem zajišťují rostlinné polyfenoly pigmentaci rostlin a příjem živin z půdy (např. příjmem kationtů kovů Ca, Mg, Fe, Cu, Mn).¹

Dále chrání plodiny před rostlinným morem a předčasným klíčením semen. Velké uplatnění nachází polyfenoly i v průmyslovém odvětví, například při výrobě nátěrových barev a papíru, jako tvrdící činidla, v potravinářském průmyslu jako doplňkové látky (přírodní barviva a konzervační látky) a kosmetice.¹ Kosmetický průmysl využívá polyfenolické extrakty získané z různých částí a druhů rostlin (ovoce, byliny, ořechy, semena hroznů, nebo kůru ze stromů apod.), které chrání pokožku před poškozením, způsobeným slunečním zářením, a stárnutím. Uplatnění nachází polyfenoly ve farmaceutickém průmyslu: jako příklad můžeme uvést jeden Pycnogenol, což je farmaceutický přípravek, který představuje směs flavonolů, oligomery proanthokyanidinu a fenolické kyseliny extrahované z kůry borovice (*Pinus maritima*).⁶

Nejrozšířenější skupinou polyfenolů jsou flavonoidy, které se používají jako antibiotika, proti průjmu, vzniku vředů a protizánětlivé léky, dále při léčbě nemocí jako je například hypertenze, cévní křehkost, alergie, hypercholesterolemie a další.⁷

Teoretická část bakalářské práce nabízí přehled o výživových účincích hlavních skupin polyfenolických sloučenin, včetně jejich metabolismu, účinků na biologickou dostupnost živin a antioxidačních účinků stejně jako stručný popis chemického složení polyfenolů a jejich výskyt v rostlinných potravinách.¹

2.1.1 Struktura fenolových sloučenin

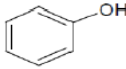
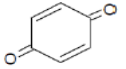
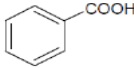
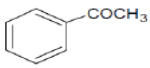
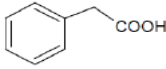
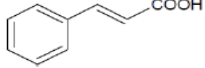
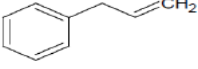
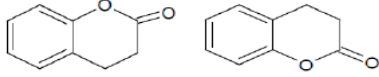
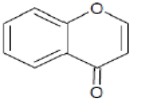
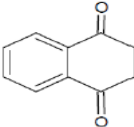
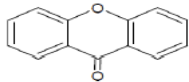
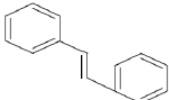
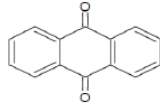
Již po dlouhou dobu představují fenolické sloučeniny nebo polyfenoly jednu z nejpočetnějších a široce rozšířených skupin látek s více než 8000 fenolických struktur.

Ve své nejzákladnější struktuře mají sloučeniny (poly)fenolů jednu nebo více hydroxylových skupin navázaných na benzenové jádro. Fenol představuje amfifilní sloučeninu, která v sobě kombinuje hydrofobní charakter aromatického jádra s hydrofilním charakterem polární hydroxylové skupiny, která může mít funkci donoru nebo akceptoru ve vodíkové vazbě.⁸

Polyfenoly jsou produkty sekundárního metabolismu rostlin. Jejich biogeneze zahrnuje dvě hlavní syntetické drahy: šikimátovou a acetátovou. Přírodní polyfenoly můžeme nalézt jako jednoduché molekuly, jako jsou fenolické kyseliny, nebo jako vysoce polymerované sloučeniny, jako jsou taniny. Nejčastěji se polyfenoly vyskytují jako produkty kondenzace s jednou nebo více molekulami sacharidu (vazba přes atom kyslíku původní hydroxylové skupiny, tzv. O-glykosidy; existují i glykosidy s vazbou mezi uhlíkovými atomy polyfenolu a sacharidu, tzv. C-glykosidy). Připojenými cukry mohou být monosacharidy, disacharidy, nebo dokonce i oligosacharidy. Nejběžnější cukerný zbytek je glukóza, nicméně časté jsou i galaktóza, rhamnosa, xylosa a arabinosa, stejně jako glukuronová a galakturonová kyselina a mnoho dalších. Běžné jsou také konjugace s jinými sloučeninami jako jsou například karboxylové a organické kyseliny, aminy, lipidy a jiné fenoly.¹

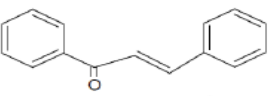
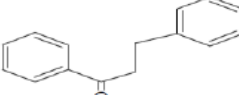
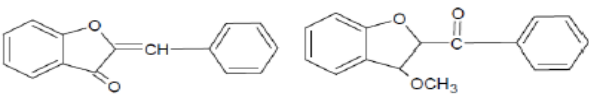
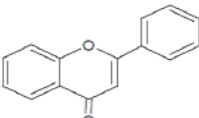
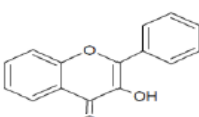
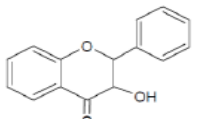
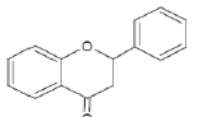
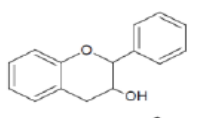
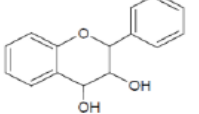
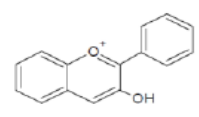
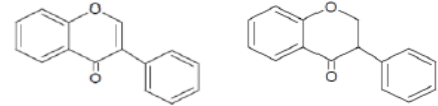
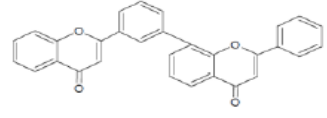
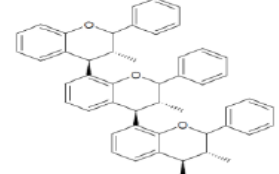
Polyfenoly mohou být rozděleny podle své základní chemické struktury do nejméně deseti tříd.¹ Tabulka I. znázorňuje základní chemickou strukturu hlavních polyfenolických sloučenin.

Tab. I: Hlavní třídy (poly)fenolických sloučenin

Třída	Základní kostra	Základní struktura
Jednoduché fenoly	C_6	
Benzoquinony	C_6	
Fenolické kyseliny	$C_6 - C_1$	
Acetofenony	$C_6 - C_2$	
Fenylctové kyseliny	$C_6 - C_2$	
Hydroxyskořicové kyseliny	$C_6 - C_3$	
Fenylpropany	$C_6 - C_3$	
Kumariny, isokumariny	$C_6 - C_3$	
Chromony	$C_6 - C_3$	
Naftoquinony	$C_6 - C_4$	
Xanthany	$C_6 - C_1 - C_6$	
Stilbeny	$C_6 - C_2 - C_6$	
Anthraquinony	$C_6 - C_2 - C_6$	
Flavonoidy	$C_6 - C_3 - C_6$	
Lignany, neolignany	$(C_6 - C_3)_2$	
Ligniny	$(C_6 - C_3)_n$	

Flavonoidy představují nejvýznamnější samostatnou skupinu polyfenolů a mohou být rozděleny na dalších 13 tříd, s více než 5000 sloučeninami, které jsou popsány v tabulce II.

Tab. II: Rozdělení flavonoidů

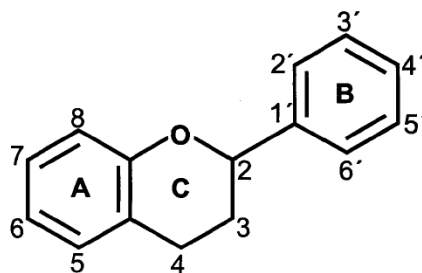
Flavonoid	Základní struktura
Chalkony	
Dihydrochalkony	
Aurony	
Flavony	
Flavonoly	
Dihydroflavonoly	
Flavanony	
Flavanoly	
Flavandioly nebo leucoanthokyanidiny	
Anthokyanidiny	
Isoflavonoidy	
Biflavonoidy	
Proanthokyanidiny nebo kondensované taniny	

2.1.2 Jednoduché fenoly a flavonoidy

Jednoduché fenolové deriváty a flavonoidy patří mezi nejběžnější nízkomolekulární fenolové sloučeniny. Jednoduché fenoly (C_6), jako je například fenol, kresol, thymol, resorcinol, orcinol, atd., jsou široce rozšířené mezi různými druhy rostlin, včetně hydrochinonu a jeho derivátů (např. arbutin, sesamol) a floroglucinolu. Fenoly s C-C strukturou (Tab. 1) jako jsou například fenolické kyseliny (např. gallová, vanilinová, syringová, hydroxybenzoová) a aldehydy (např. vanillin, syringaldehyd, p-hydroxybenzaldehyd), jsou také poměrně časté pro vyšší rostliny a kapradiny. Literatura poskytuje málo informací o fenyloctových kyselinách a acetofenonech (C_2 - C_6).¹

Další významnou skupinou nízkomolekulárních fenolů jsou deriváty fenylypropanu (fenylpropanoidy) (C_6 - C_3). Nejdůležitější fenylypropanoidy jsou hydroxyskořicové kyseliny (p-kumarová, kávová, ferulová, sinapová) a jejich deriváty. Skořicové alkoholy (koniferyl alkohol nebo guaiacyl, sinapyl alkohol nebo syringyl a p-kumaryl alkohol) tvoří základní složku ligninů a představují tak jednu z významných skupin rostlinných fenolů.⁹ Fenylypropanoidy a další jednoduché fenoly (kyselina benzoová a deriváty benzaldehydu) jsou obvykle kovalentně spojeny s polysacharidy buněčné stěny (převážně esterovou vazbou s arabinosovou jednotkou hemicelulosity) nebo s ligninem obsaženým v jádru buňky.¹⁰

Základní strukturu flavonoidů tvoří difenylypropan, který je tvořen dvěma aromatickými kruhy propojenými prostřednictvím lineárního řetězce, který je obvykle součástí kyslíkatého heterocyklu.



Obr. 1: Základní struktura flavonoidů a systém, který se používá pro číslování uhlíkových atomů flavonoidového skeletu. Převzato z literatury ¹.

Z hlediska biogeneze kruh A obvykle pochází z molekuly resorcinolu, nebo floroglucinolu syntetizovaného acetátovou cestou, zatímco kruh B je syntetizován v šikimátové cestě. V rostlinách můžeme flavonoidy nalézt jako aglykony, nebo častěji se vyskytující deriváty glykosidu. Mezi flavonoidy jsou nejvíce rozšířeny flavony (např. apigenin, luteolin, diosmetin), flavonoly (např. kvercetin, myricetin, kaempferol) a jejich glykosidy. Vyskytují se v rostlinné říši, s výjimkou řas a hub. Flavonoly můžeme nalézt jako o-glykosidy a flavony jako O-glykosidy a C-glykosidy.¹¹ Pro strukturu C-glykosidu flavonu je charakteristická vazba uhlík–uhlík mezi anomerním uhlíkem molekuly cukru a uhlíkem C-6 nebo C-8 uhlíkového jádra flavonu. V C-glykosidech se cukry neštěpí kyselou hydrolyzou, kdežto u O-glykosidů se štěpí. Flavanoly (např. naringenin, hesperidin) se nejvíce vyskytují v citrusovém ovoci a švestkách v podobě O- nebo C-glykosidů. Variabilita skupiny flavonoidů je pozoruhodná. K dnešnímu dni je popsáno asi 380 flavonolových glykosidů a 200 odlišných glykosidů kvercetinu a kaempferolu.

Izoflavony (např. genistein, daidzein) mají ve své struktuře B kruh z molekuly flavonu, který je připojen k uhlíku C-3 heterocyklu. Tato skupina se vyskytuje zejména v luštěninách.

Nejdůležitější skupinou vodou-rozpustných rostlinných pigmentů jsou antokyaniny, které zodpovídají za barvy květů a plodů vyšších rostlin. Pod termínem anthokyanin se skrývají glykosidy anthokyaniny (např. pelargonidin, malvidin, cyanidin), které se kromě glykosylace běžně vyskytují i ve vazbách na aromatické a alifatické kyseliny, a rozšířené jsou i methyl esterové deriváty. Za barvu červeného vína jsou zodpovědné anthokyaniny a polymerní pigmenty vytvořené z anthokyaninů kondenzací s jiným flavonoidem.¹²

Většina z jednoduchých fenolů a flavonoidů se vyznačuje relativně nízkou molekulovou hmotností a jejich rozpustnost závisí na polaritě a chemické struktuře molekuly (stupeň hydroxylace, glykosylace, acylace, atd.).

2.1.3 Taniny

Taniny tvoří další skupinu rostlinných polyfenolů a jsou to sloučeniny středně vysoké molekulové hmotnosti.¹ Označení taniny se používá především pro rostlinné polyfenoly s molekulární hmotností mezi 500 a 3000 Da.² Taniny s vyšší molekulární hmotností až 30 000 Da byly nalezeny v luskách rohovníku (Leguminosae).¹³ Taniny jsou vysoce hydroxylované molekuly a mohou tvořit nerozpustné komplexy se sacharidy a bílkovinami. Tvorba nerozpustných komplexů rostlinných taninů je zodpovědná za trpkost potravin bohatých na taniny, z důvodu vysrážení slinných bílkovin. Termín "tanin" pochází ze schopnosti těchto sloučenin vyčiňovat zvířecí kůži na vydělanou kůži tím, že se vytvoří stabilní komplex tanin-proteinový komplex s kožním kolagenem. Rostlinné taniny lze rozdělit do dvou hlavních skupin: (1) hydrolyzovatelné a (2) kondenzované taniny. Třetí skupina, phlorotaniny, se nachází pouze v mořských chalužích, které nejsou běžně konzumovány lidmi.¹⁴

2.1.3.1 Hydrolyzovatelné taniny

Hydrolyzovatelné taniny se skládají z kyseliny gallové a jejího dimerního kondenzačního produktu, hexahydroxydifenyldikarboxylové kyseliny spojené esterovou vazbou s polyolem, který bývá především glukóza.¹⁵ Vysokomolekulární polymery se mohou tvořit oxidační kondenzací těchto metabolitů na jiném galloylu nebo na molekule hexahydroxydifenyly. Jak naznačuje název této skupiny taninů mohou se snadno hydrolyzovat kyselinou, alkálií, teplou vodou a enzymatickou činností, jejichž produktem jsou vícesytné kyseliny, alkohol a fenyلكarboxylová kyselina. Podle povahy fenyلكarboxylové kyseliny lze skupinu hydrolyzovatelných taninů dále rozdělit na gallotaniny (odvozené od kyseliny gallové) nebo ellagotaniny (odvozené od kyseliny hexahydroxydifenyldikarboxylové), které si vzaly své jméno od laktonu kyseliny ellagové. Nejznámější hydrolyzovatelný tanin je kyselina taninová, která patří do skupiny gallotaninů a je složená z molekuly pentagalloylu glukózy, která může být dále esterifikována dalšími pěti jednotkami kyseliny gallové.¹

2.1.3.2 Kondenzované taniny

Kondenzované taniny jsou vysokomolekulární polymery, v jejichž základní struktuře je obsažena monomerní jednotka flavan-3-ol (katechin, epikatechin, atd.) s flavan-3,4-diolem nebo molekulou leucoanthokyanidinu jako jeho prekursoru. Oxidační kondenzace probíhá mezi uhlíky C-4 heterocyklu a atomy uhlíku C-6 nebo C-8 sousedních jednotek.¹⁵

Analýza vysoce polymerovaných molekul je velmi komplikovaná, proto velká část literatury vztahující se k problematice obsahu kondenzovaných taninů v různých rostlinách odkazuje pouze na oligomerní proanthokyanidiny (dimery, trimery, tetrametry). Proanthokyanidiny se však můžou vyskytovat jako polymery se stupněm polymerizace 50 a vyšší. Nejčastěji popsané kondenzované taniny mají molekulové hmotnosti přibližně 5000 Da, i když, jak již bylo dříve uvedeno, byly objeveny i polymery s molekulovou hmotností větší než 30000 Da.¹ Proces vedoucí k tvorbě kondenzovaných taninů je autooxidativní nebo enzymatická polymerace jednotek flavan-3-olu a flavan-3,4-diolu. Kyselá hydrolyza v alkoholových roztocích rozkládá interflavanooidové vazby a poskytuje anthokyanidiny. Tato reakce se používá pro stanovení proanthokyanidinových molekul. Látky podobné phlobaphenu (rezavě hnědé komplexní látky rozpustné v alkoholu a nerozpustné ve vodě, vyskytující se v dubové kůře, které vznikají zahříváním kvercentaninu nebo kondenzovaných taninů se zředěnými minerálními kyselinami) vznikají při zahřívání kondenzovaných katechinů v roztocích minerálních kyselin.⁷ Oligomerní proanthokyanidinové a nízko-molekulární hydrolyzovatelné taniny jsou rozpustné v různých vodných a organických rozpouštědlech (např. aceton, metanol a voda), zatímco vysoko-molekulární hydrolyzovatelné a kondenzované taniny jsou nerozpustné. Taniny jsou nerozpustné i v situaci, kdy tvoří komplexy s proteiny nebo polysacharidy buněčné stěny. Tato nerozpustnost taninů je zodpovědná za závažné chyby v kvantifikaci polyfenolického obsahu rostlin (vynecháním kvantifikace nerozpustných nebo neextrahovatelných taninů), protože polyfenoly jsou obvykle analyzovány v extraktech.¹

2.1.4 Polyfenoly v potravě

Polyfenoly jsou obsaženy téměř v každé rostlinné potravě (zelenina, obiloviny, luskoviny, ovoce, ořechy, atd.) a nápoje (vino, jablečný mošt, pivo, čaj, kakao, atd.). Jejich obsah se významně liší mezi odrůdami téhož druhu a také v jednotlivých částech rostliny. Například tvorba flavonových a flavonolových glykosidů značně závisí na světle, proto nejvyšší koncentrace těchto sloučenin se obvykle nacházejí v listech a vnějších částí rostlin, zatímco v podzemní části rostliny obsahují pouze stopové množství.¹¹

Také genetické faktory, podmínky životního prostředí, klíčivost a stupeň zralosti značně ovlivňují obsah polyfenolů v rostlinné potravě.¹⁶

Polyfenoly jsou částečně zodpovědné za organoleptické a výživové vlastnosti rostlinné potravy. Trpkost a hořkost potravin a nápojů závisí na obsahu polyfenolických sloučenin.

Zpracování nebo skladování potravinářských výrobků může způsobovat oxidaci polyfenolů, která může mít za následek prospěšné nebo nežádoucí vlastnosti finálních produktů. Jako příklad žádoucí oxidační změny lze uvést zhnědnutí kakaa během zpracování nebo oxidační polymeraci čajových polyfenolů během výroby černého čaje, která zodpovídá za vývoj charakteristických a žádoucích organoleptických vlastností. Naopak nechtěné enzymatické reakce, které vedou k hnědnutí fenolických sloučenin (katalyzované polyfenolickými oxidasami) nebo neenzymatické hnědnoucí reakce, které jsou zodpovědné za vznik nežádoucích barev a chutí ovoce a zeleniny.¹

K dispozici je velké množství literatury, která se zabývá složením a obsahem polyfenolů v rostlinné potravě a nápojích. Vzhledem ke složitosti této široké skupiny rostlinných metabolitů zůstávají mnohé polyfenoly neidentifikovány, proto jsou informace v literatuře v důsledku tohoto jen neúplné, ale někdy také rozporuplné a obtížně porovnatelné.

2.1.4.1 Obsah polyfenolických látek v některých potravinách a nápojích

Obsah polyfenolických látek v cereáliích je velmi rozmanitý, pohybuje se od 8,6 (mg/100g suché hmoty) v rýži až po 1500 (mg/100g suché hmoty) v ječmenu. V luštěninách se polyfenoly objevují v rozmezí od 34 (mg/100g suché hmoty) v běžných fazolích až po 1710 (mg/100g suché hmoty) v holubích fazolích. V zelenině má nejnižší obsah polyfenolických látek růžičková kapusta 6-15 (mg/100g čerstvé hmoty) a nejvyšší obsah se nachází v cibuli 100-2025 (mg/100g čerstvé hmoty). Nejvíce polyfenolů při konzumaci ovoce

můžeme získat z černého rybízu 140-1200 (mg/100g čerstvé hmoty) a naopak nejméně při konzumaci hrušky 2-25 (mg/100g čerstvé hmoty). Velmi zajímavá je variabilita polyfenolických sloučenin v ovocných džusech, kde jablečný džus obsahuje pouze 2-16 (mg/l) polyfenolů, zatímco pomerančový džus obsahuje 370-7100(mg/l) polyfenolů. Z alkoholických nápojů obsahuje nejvíce polyfenolických látek červené víno a to 1000-6000 (mg/l).¹

2.1.4.2 Příklady potravin bohatých na polyfenoly

Jablko je hlavním zdrojem fenolových sloučenin, protože jeho konzumace je rozšířena v mnoha zemích a je na trhu dostupné po celý rok, proto představuje hlavní zdroj antioxidantů ve stravě. Konzumace jablek snižuje rizika výskytu mnoha nemocí jako jsou rakovina plic, astma, diabetes typu-2, ischemická srdeční choroba a podobně. Obecně platí, že hlavních pět skupin polyfenolických sloučenin lze nalézt v různých odrůdách jablek a to hydroxyskořicové kyseliny, flavan-3-oly, prokyanidiny, anthokyany, flavonoly a dihydrochalkony. Flavan-3-oly se mohou vyskytovat v jablku jako monomery (katechin a epikatechin), oligomery a polymery (prokyanidiny). Flavonoly jsou často navázány na cukerný zbytek (nejčastěji galaktosa, glukóza, rhamnóza, arabinóza a xylóza), zatímco dihydrochalkony jsou kondenzovány především s glukózou a xyloglukózou.¹⁷

Olej z lněného semene je bohatý na polynenasycené mastné kyseliny a obsahuje více než 50 % linoleové kyseliny, což je omega-3 esenciální mastná kyselina. Konzumace omega-3 mastných kyselin je důležitá z mnoha fyziologických důvodů a bývá spojena s nižším výskytem mnoha druhů onemocnění (zánětlivá a kardiovaskulární onemocnění). Bohužel když je olej vystaven působením kyslíku, polynenasycené mastné kyseliny se velmi rychle oxidují na hydroperoxydy a další produkty rozkladu. Tato oxidace vytváří radikálové formy kyslíku, které mohou způsobit nevratné poškození při reakci s biologickými molekulami jako je DNA, lipidy a proteiny. Jako přírodní antioxidant se používá také olej z lněných semínek, který obsahuje čtyři fenolické sloučeniny: myricetin, katechin, genistein a kávuovou kyselinu, které reprezentují čtyři třídy fenolových sloučenin a sice flavanolů, flavanolů, isoflavonů a hydroxyskořicové kyseliny.¹⁸

Jako příklad nápojů bohatých na polyfenoly stojí za zmínku červené víno. Za zvýšení zájmu o obsah polyfenolů v červeném víně se postarala epidemiologická studie zvaná „francouzský paradox“, která odhalila nižší výskyt srdečních koronárních chorob v důsledku

pravidelné konzumace červeného vína a to i přes vysoký příjem tuků v potravě. Červené víno je bohaté na polyfenoly díky hroznovému vínu, bohatému na tuto skupinu přírodních látek, z kterého se vyrábí. Tyto polyfenoly zahrnují flavanoly a jejich proanthokyanidinové oligomery, anthokyaniny, hydroxylovatelné stilbeny jako resveratol, flavonoly jako kaempferol a kvercetin, stejně jako ellagitaniny a kyselinu ellagovou z dubu v důsledku zrání vína v dubových sudech. Hlavní sloučenina, která odpovídá za pozitivní dopad červeného vína na lidské zdraví je bioaktivní polyfenol resveratrol. Resveratol může inhibovat LDL peroxidaci a agregaci krevních destiček, dále působí jako antimutagen a má protizánětlivé účinky.²

2.1.5 Biologická dostupnost polyfenolických látek

Absorpce a metabolismus fenolů v potravě jsou závislé především na jejich chemické struktuře, která je závislá na faktorech, jakými jsou například stupeň glykosylace a acylace, konjugace s jinými fenoly, molekulární hmotnosti, stupni polymerace a rozpustnosti. Obrovská variabilita této skupiny látek, stejně jako jejich výskyt v rostlinných materiálech, jako složité směsi fenolických sloučenin způsobuje velké obtíže při studiu jejich biologické dostupnosti a fyziologických a výživových účincích.¹

2.1.6 Metabolismus polyfenolických látek

Rozpustné polyfenoly jsou metabolizovány v zažívacím traktu. Přes sliznici tenkého střeva mohou být přímo vstřebávány aglykony a volné jednoduché fenolické sloučeniny, flavonoidy (kvercetin, genistein) a fenolické kyseliny. U volných fenolů (kyselina skořicová a deriváty jako p-kumarová, ferulová, kávová, atd.) byla prokázána absorpce prostřednictvím trávicího traktu, jak v experimentu *in vivo* u krysu, tak v experimentu *in vitro* v izolované střední části tenkého střeva u potkana. Naopak glykosidy musí být před absorpcí hydrolyzovány na jejich odpovídající aglykony. Jelikož savci nemají odpovídající β -glykosidasy, předpokládalo se, že nedochází k absorpci v tenkém střevě. Ukázalo se však, že k částečné absorpci glykosidů kvercetinu dochází v horní části střeva, zřejmě díky působení glykosidas bakterií, které jsou přítomny v tlustém střevě. Nicméně většina glykosidů projde do tlustého střeva, kde se hydrolyzují pomocí mikroflóry slepého střeva a vytvářejí volné aglykony.¹ Bylo jasně prokázáno zprostředkování bakteriálních enzymů v biologické dostupnosti fenolických glykosidů Griffithsem a Barrowem, kteří ukázali, že jsou glykosidy

flavonoidů jako takové vyloučeny ve výkalech krys bez bakterií (krysy jsou chovány ve speciálním inkubovaném chovu bez bakterií). Bakteriální fermentace sacharidů uvolnila vázané fenoly z vlákniny, které by byly metabolizovány jako extrahovatelné polyfenoly.¹⁹

V tlustém střevě jsou aglykony vstřebávány přes střevní epitel a methylovány nebo konjugovány s glukuronovou kyselinou nebo síranem v játrech. Hlavní orgán, který se podílí na metabolismu polyfenolů jsou játra, ačkoliv účast dalších orgánů, například ledvin nebo střevní sliznice vyloučit nelze, neboť obsahují enzymy zapojené do metabolismu polyfenolů.²⁰ V plazmě krys, kterým byly podávány flavanoly (katechin), flavonoly (kvercetin, rutin) a izoflavony (genistein), byly objeveny konjugované a 3-O-methylované deriváty. Tyto metabolity jsou vylučovány v moči nebo ve žluči. V tomto případě mohou vstoupit do enterohepatického cyklu pokud byly dekonjugovány působením střevní mikroflóry a pak se znovu vstřebat. Nebo mohou být také plně metabolizovány po hydrolyze jejich flavonové struktury (otevřením heterocyklu), zprostředkované bakteriálními enzymy a převedeny na jednoduché fenolické kyseliny. Citlivost polyfenolů vůči bakteriálnímu rozkladu určuje umístění hydroxylových skupin na skeletu molekuly. Fenolické kyseliny vzniklé jako štěpné produkty jsou vstřebávány prostřednictvím střevní sliznice a vylučují se močí.²¹

O absorpci a metabolismu polyfenolů ve střevě existuje mnoho důkazů, ale je velmi málo informací o stabilitě fenolických sloučenin nebo jejich konjugátů a derivátů v těle. Studie na zvířatech s izotopově značenými ¹⁴C-fenoly naznačují, že dochází pouze k částečné absorpci. Ukázalo se, že ¹⁴C-kvercetin, který byl podáván krysám se absorboval z 20 %, 30 % této látky se vyloučilo, a zbývajících 50 % se metabolizovalo na fenolické kyseliny a CO₂.¹ Podobně, King a kol. uvádí asi 20 % absorpci sojových izoflavonů podávaných krysám s tím, že se vyloučilo 20 % požití dávky ve výkalech. V tomto experimentu nebyly pozorovány žádné rozdíly mezi aglykony a glykosidy.²² Naopak Buchanan a kol. v experimentu s použitím izotopu ¹⁴C ukázali, že pouze 19 % kyseliny p-kumarové a ferulové vázaných na povrchové polysacharidy inaktivních buněčných stěn špenátu a vpravených sondou do žaludku krys se vyloučilo ve výkalech. Asi 20 % z celkové dávky bylo vyloučeno v moči a více než 34 % izotopově značeného fenolu bylo vstřebáno do tkání 18 hodin po vpravení do střev sondou, doba setrvání polyfenolů v organismu nebyla studována.²³ Experimenty na lidech (omezené na studium flavonoidů) také potvrdily pouze částečné vstřebávání polyfenolů. Absorpce orálně podávaného kvercetinu u zdravých osob, s vývodem z tenkého

střeva, se pohybuje od 24 % požitých aglykonů po 52 % glykosidů. Sojové izoflavony podávané dobrovolníkům byly absorbovány v rozmezí 9 % až 21 % v závislosti na konkrétním isoflavonu. Koncentrace celkových katechinů v krvi byla po požití černého čaje 0,17 pmol/l a až 0,55 pmol/l po požití zeleného čaje. Tyto údaje souhlasí s údaji zveřejněnými Leem a kol., který odhaduje, že absorpce čajových katechinů odpovídá přibližně 0,2-0,9 % požitě dávky.²⁴

Stabilita fenolů v těle je zkoumána pouze krátkodobě. Tento fakt má velký význam, protože některé z fyziologických účinků polyfenolů v potravě závisí na antioxidační kapacitě.¹ Manach a kol. zaznamenal, že koncentrace metabolitů kvercetinů v plazmě krysy (přízpusobených nebo nepřízpusobených na stravu bohatou na flavonoidy) se významně nezměnila 16 hodin po dosažení maxima. Tito autoři tvrdí, že rychlost eliminace metabolitů kvercetinů byla relativně nízká a vysokou plazmatickou koncentraci lze snadno zachovat s pravidelným příjmem flavonoidů v potravě.²⁵

2.1.7 Fermentace polyfenolických sloučenin

V metabolismu některých polyfenolických sloučenin hraje klíčovou roli fermentace mikroflóry. Ne všechny fenoly jsou stejně odolné k bakteriálnímu rozkladu, protože některé sloučeniny například nerozpustné kondenzované taniny, jsou zřejmě vylučovány ve výkalech bez ovlivnění střevními bakteriemi. Polyfenoly rovněž mohou ovlivňovat střevní mikroflóru a jejich fermentační kapacitu pro jiné složky potravin. *In vitro* kvašení vysoce polymerovaných kondenzovaných taninů ukázalo, že tyto kondenzované taniny nejsou ovlivněny fermentační mikroflórou. Rovněž úroveň mastných kyselin s krátkými řetězci (SCFA), jako například kyselina octová, propionová a kyselina máselná, které jsou primárními produkty střevního kvašení, nebyly ovlivněny přítomností kondenzovaných taninů. To naznačuje, že vysoce polymerované fenoly neovlivňují střevní mikroflóru.¹

Podobně obsah slepého střeva krysy, které byly krmeny stravou obsahující kondenzované taniny z hroznové drti, neovlivňuje normální *in vitro* fermentaci jablečného pektinu do kterého byly přidány bakterie z krysích střev a byl použit jako očkovací látka.²⁶

In vitro fermentace flavonoidu kvercetinů, které trvalo 72 hodin poukázalo na snížení produkce propionátu a butyrátu a vysokou produkci kyseliny octové. To naznačuje, že kvercetin je fermentován pomocí bakterií mikroflóry za otevření aromatického kruhu, což

může být vysvětlováno vysokou produkcí kyseliny octové, která pochází z úplné hydrolýzy flavonoidů a nepřítomnost jiných SCFA obvykle produkovaných během kvašení sacharidů.²⁷

Obdobně platí, že *in vitro* kvašení flavonoidů katechinu a kyseliny taninové (s kyselinou gallovou jako konstitučním monomerním fenolem) bylo také provázeno vysokou produkcí kyseliny octové po 72 hodinách fermentace, ale ne po 24 hodinách, což ukazuje, že hydrolýzy aromatického kruhu potřebují dlouhou dobu fermentace.

Závěr z těchto poznatků nám říká, že rozklad a absorpce polyfenolů v trávicím traktu závisí na povaze fenolových sloučenin a na střevní mikroflóře, jejíž fermentační účinek na jiné komponenty je ovlivněn typem polyfenolických sloučenin.¹

2.1.8 Antioxidační aktivita polyfenolů v potravinách

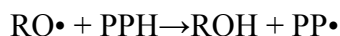
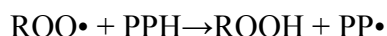
Antioxidanty ať už v přírodní nebo syntetické formě, jsou schopny zhaset volné radikály a tím zabraňovat oxidačním procesům v lidském těle.

Reaktivní formy kyslíku ve formě hydroxidových radikálů, superoxidových aniontů, peroxidu vodíku a singletového kyslíku jsou neustále produkovány v eukaryotních buňkách jako důsledek mitochondriálního přenosu elektronů, nebo jako vedlejší produkty reakcí katalyzovaných různými enzymy, které jsou nezbytné pro biologické procesy ve většině živých organismů. Nicméně nadměrné množství reaktivních forem kyslíku jako následek působení slunečního záření, kouření a znečištění mohou způsobit oxidační stres a proto nadprodukce oxidačních radikálů může vést k poškození tkáně.²⁸

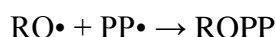
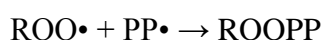
Nejvíce diskutovaná vlastnost polyfenolů je jejich schopnost vystupovat v roli antioxidantů. Epidemiologické studie prokázaly, že zvýšená konzumace fenolických antioxidantů úzce souvisí se snížením rizika kardiovaskulárních onemocnění a některými typy rakoviny.¹ Dále jsou antioxidační účinky polyfenolů v úzkém vztahu souvisejícím s prevencí chronických nemocí a poruch přicházejících s věkem, jako jsou kardiovaskulární nemoci (např. ateroskleróza), karcinogeneze, neurodegradace (např. Alzheimerova choroba) a zhoršování kvality kůže. Různé typy polyfenolů (fenolické kyseliny, hydrolyzovatelné taniny a flavonoidy) také prokázaly své antikarcinogenní účinky. Polyfenoly mohou zasahovat do několika kroků, které vedou k rozvoji zhoubných nádorů, čímž chrání DNA proti oxidačnímu poškození, zneškodňují karcinogeny, potlačují expresi mutovaných genů a aktivitu enzymů podílejících se na aktivaci prokarcinogenů a aktivují enzymy zapojené v systému detoxikace

xenobiotik.¹ Fenolické antioxidanty fungují také jako chelatační činidla kovových iontů (jako jsou Fe(II)/Cu(I) a Fe(III)/Cu(II)), které jsou schopné katalyzovat peroxidaci lipidů.²

Fenolické antioxidanty zasahují do oxidace tuků a jiných molekul rychlým darováním atomu vodíku radikálům, jak je znázorněno v následující reakci:



Fenoxylové radikálové meziprodukty PP• jsou navíc relativně stabilní a proto se nová řetězová reakce špatně zahajuje. Radikálové meziprodukty rovněž způsobují terminaci propagace prostřednictvím reakce s jinými volnými radikály.¹

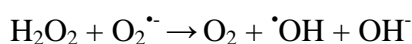


Za určitých podmínek (vysoká koncentrace fenolických antioxidantů, vysoké pH, přítomnost železa), však mohou fenolické antioxidanty zahájit proces autooxidace a chovat se jako pro-oxidanty. Účinnost polyfenolů jako antioxidačních sloučenin značně závisí na jejich chemické struktuře. Fenol sám je neaktivní jako antioxidant, ale ortho- a para-difenoly mají antioxidační kapacitu, která roste s nahrazováním atomů vodíku ethyl nebo n-butyl skupinami. Flavonoidy patří mezi nejsilnější rostlinné antioxidanty, protože mají jeden nebo více strukturálních prvků zapojených do antiradikálové činnosti. Jedním z nejúčinnějších přírodních antioxidantů je kvercetin, který patří mezi flavonoly a který kombinuje všechny tyto vlastnosti. I antioxidační účinky flavonoidů přímo souvisejí s jejich stupněm hydroxylace a snižují se s přítomností cukru. Flavonoidy velmi účinně zachycují hydroxylové a peroxidové radikály, ale účinnost při zachycování superoxidového aniontu zatím není jasná. Jak bylo zmíněno dříve, polyfenoly působí jako chelatační činidla pro kovy a potlačují Fentonovu a Haber-Weissovou reakci, která je významným zdrojem radikálu aktivního kyslíku.² Fentonova reakce, je reakce peroxidu vodíku v kyselém prostředí s dvojmocným železem (tzv. Fentonovo činidlo):



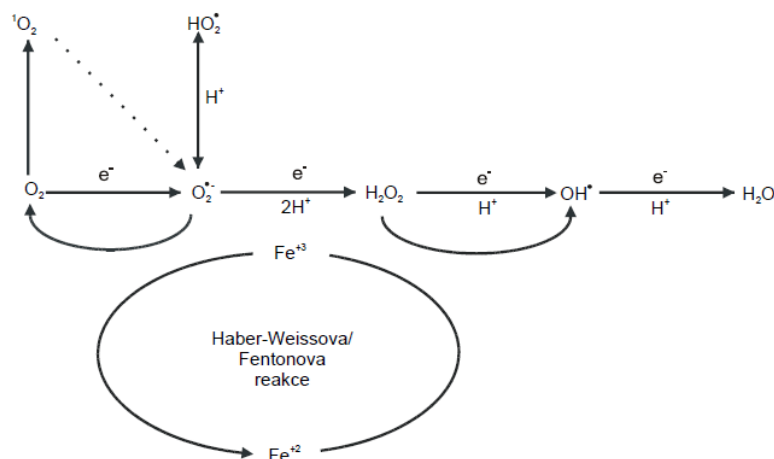
Vzniklé ionty Fe³⁺ mohou dále reagovat s H₂O₂ a hydroxyperoxylovým radikálem, čímž dochází k regeneraci Fe²⁺.²⁹

Haber-Weisova reakce je reakce mezi superoxidem a peroxidem vodíku za vzniku hydroxylového radikálu³⁰:



Tato reakce se urychluje katalytickým působením přechodných kovů (Fe, Cu).

Celková redukce molekulárního kyslíku na vodu vyžaduje čtyři elektrony a je vždy doprovázená postupnou jedno až tří elektronovou redukcí, kdy dochází ke tvorbě superoxidového radikálu, peroxidu vodíku a hydroxylového radikálu³¹



Obr. 2: Schéma redukce molekulárního kyslíku na vodu. Převzato z literatury³¹.

Flavonoidy si zachovávají volnou kapacitu pro chytání radikálů i po vytvoření komplexu s kovovými ionty. Přestože antioxidační účinky se připisují pouze rozpustným fenolickým sloučeninám (extrahovatelným polyfenolům), nedávná studie naznačila, že neextrahovatelné polyfenoly (polymerní proanthokyanidinové a vysoko molekulární hydrolyzovatelné taniny) jsou 15 až 30 krát účinnější v zhášení peroxy radikálů, než jednoduché fenoly. Protože se tyto sloučeniny neabsorbují, mohou uplatnit svou antioxidační aktivitu v oblasti trávicího traktu a chránit tak tuky, proteiny a sacharidy před oxidačním poškozením během trávení a šetří tak rozpustné antioxidanty. Pomocí různých *in vitro* modelů většina studií prokázala činnost antioxidačních polyfenolů a následně byly fenolické sloučeniny klasifikovány podle jejich antioxidační kapacity nebo antiradikálové účinnosti. Role polyfenolů *in vivo* není jasná. Oxidační účinnost polyfenolů závisí na rozsahu absorpce a metabolismu těchto sloučenin, stejně jako na jejich methoxylační činnosti a konjugované formě cirkulující v plasmě. Jak bylo uvedeno výše, absorbuje se pouze určité množství polyfenolů z potravin *in vivo* a proto byly detekovány velmi nízké hladiny čajových katechinů v plasmě po požití čaje. I tyto nízké koncentrace se jeví jako postačující.¹

Antioxidační polyfenoly, zejména flavonoidy, jsou silné inhibitory oxidace. Bylo navrženo několik mechanismů, kterými flavonoidy uplatňují svůj ochranný účinek: (1)

snížení tvorby volných radikálů, (2) ochrana tokoferolu v LDL oxidaci, (3) obnova oxidovaných tokoferolů a (4) chelatace kovových iontů.¹

2.2. Světlice Barvířská (*Carthamus tinctorius*)

2.2.1 Původ a rozšíření

Světlice barvířská neboli saflor pochází z Přední Asie. Místa původního výskytu této rostliny jsou Indie, Afghánistán a Egypt. První průmyslová pěstování safloru se objevila v Jihozápadní Asii, Africe a Etiopii. Dále se světlice rozšířila do dalších krajů Blízkého východu, antického Řecka a dále na východ. Do Evropy se dostala od Arabů z Afriky. V dávných dobách se především využívalo jejich barvířských a léčivých schopností. S nástupem syntetických barviv začalo upadat její pěstování, což přišlo v 18. století do západní Evropy.

Až v první polovině 19. století objevili obyvatelé Blízkého východu, ve středozeří, v Indii, Malé Asii a dále na východ až po Afganistan, využití světlice jako olejniny a začali ji pěstovat pro její semena.³²



Obr. 3: Světlice barvířská . Převzato z literatury ³³.

Ještě ve 20. století se u nás světlice využívala jako přírodní barvivo potravin. V této době jsou jako velkoproducenti světlice označovány Indie, Mexiko, USA a Kanada a z Evropských států to jsou Ruská federace, Maďarsko, Itálie a Francie.

V České republice byla světlice barvířská pěstována před druhou světovou válkou a v padesátých letech minulého století na ploše několika tisíců hektarů zejména v okolí Žatce, Slaného a v suchých oblastech jižní Moravy.

V současnosti je nejvíce rozšířena ve střední Asii, Indii a Středomoří a je typickou plodinou stepních a polostepních oblastí.³²

2.2.2 Botanická charakteristika

Rod *Carthamus* zahrnuje 13 druhů a člení se do pěti sekcí, geneticky homogenních, dobře charakterizovaných kombinací morfologických, cytologických a chorologických znaků. Saflor připomíná svým vzhledem bodlák a je jednoletá rostlina, která patří do čeledi hvězdnicovitých (*Asteraceae*). S velkou pravděpodobností se vznik světlice barvířské připisuje skřížení světlice vlnaté a světlice obecné vyskytující se jako plevel od severní Indie až po Turecko.

V evropských podmínkách je lodyha světlice barvířské vysoká 80–150 cm, přímá, lysá, bělavě žlutá a lesklá, na bázi mírně dřevnatější. Může být v horní části chudě chocholičnatě rozvětvená až bohatě větvená. Kořen je kulový. Dosahuje až do hloubky 2,5 m a umožňuje tak příjem živin z hlubších vrstev půdy. Barva listů kolísá podle stanoviště od světle zelené do tmavozelené. Listy jsou střídavé, jednoduché, všechny zpravidla nedělené (vzácně se tvoří listová růžice zpeřeně členových listů), dolní podlouhlé až vejčité, stažené v křídlatý řapík, střední a horní široce přisedlé, podlouhlé kopinaté, od lodyhy vzpřímeně odstálé, tuhé, často s okrajem ostnitě zubatým. Podobný charakter mají i vnější zákrovní listeny, zakončené podle formy více či méně ostnitou špičkou anebo s redukovanými ostny. Podle přítomnosti či absenci ostnů se rozlišují dvě formy světlice barvířské: ostnitá a bezostná.³²

Soukvětí vytváří úbor o průměru 1,5–3 cm. Počet květních úborů je závislý na intenzitě tvorby bočních větví a pohybuje se podle odrůdy a stanoviště od 15 do 60. Kvetení úborů na rostlině probíhá shora dolů a trvá 3 až 4 týdny.

Kvete na podzim (dozrává koncem srpna až začátkem září), květy jsou v úborech se štětinatým lůžkem. Jsou žluto–oranžovo–červené, plné, husté a vonné. Když se květy včas neposbírají, tak se promění v chmýří a rozletí se. Doba kvetení trvá 3–4 týdny. Plodem je nažka při vrcholu zaoblená, na bázi zkosená, nevýrazně čtyřhranná, na povrchu bílá, matná, zpravidla zcela bez štětinovitého chmýru.



Obr. 4: Květ světlice barvířské. Převzato z literatury³⁴.

Nejprve rozkvétají úbory na vrcholových větvích, poté rozkvétají vedlejší větve. Kvetení v úboru probíhá od kraje do středu. U vyšlechtěných odrůd se úbory, na rozdíl od planých druhů, po dozrání neotvírají a nažky nevypadávají. Světlice barvířská je z větší části samosprašná, hmyzosnubná, opylovaná především včelami, řidčeji čmeláky.

Semeno je bílé, hranaté, pokryté tvrdou a hladkou šupinkou, uvnitř je vyplněno bílou, tučnou a sladkou dužinkou.



Obr. 5: Semena světlice barvířské. Převzato literatury³⁵.

2.2.3 Využití produktu

Světlice se pěstuje pro svoje květy ze kterých bylo izolováno více než 200 sloučenin, kde chalkonové flavonoidy jsou hlavní složkou vodného extraktu. Tyto přírodní pigmenty našly uplatnění v mnoha průmyslových oblastech.³²

Světlice slouží jako zdroj oleje, který je polovysychavý a lisuje se ze semen. Její semena obsahují 17 % až 50 % oleje a mají velmi tvrdou slupku a proto není snadné olej vylisovat. Podmínky prostředí výrazně ovlivňují obsah oleje, který je do značné míry ovlivněn i genotypově a teplotou při dozrávání. Ideální teplota při dozrávání se pohybuje v rozmezí od 20 °C do 35 °C s kolísáním teploty nad nebo pod toto rozmezí klesá obsah oleje. Při dozrávání nažek v nich roste obsah oleje a klesá obsah bílkovin. Olej ze světlice se vyznačuje žlutou až žluto-červenou barvou. Tento olej se používá výhradně ve studené kuchyni a vyznačuje se vysokou kvalitou. Obsah jednotlivých kyselin se liší v jednotlivých odrůdách, ale většina obsahuje 80 % kyseliny linolové, což je extrémně vysoké množství a velmi nízký obsah kyseliny linoleové. Tyto dvě kyseliny jsou označovány jako hlavní dietní esenciální mastné kyseliny.

Tab. III: Kvalitativní složení světlicového oleje

Obsah oleje(%)	Procentický obsah jednotlivých mastných kyselin v oleji v semeni						
	Palmitová	Stearová	Olejová	Linolová	Linolenová	Arachová	Eruková
17 – 50	4,1 - 7,5	0,9 - 9,5	7,1 79,0	8,7 -80,5	0,1	<0,5	<0,2

Tento olej má taky vysoký obsah přírodního vitamínu E. Má lehkou oříškovou chuť a hodí se k salátům a zeleninovým pokrmům. Olej světlice barviřské patří k nejkvalitnějším olejům. Saflorový olej může být využit také k léčebným účelům, kde lze použít jako doplňkovou léčbu při ischemické chorobě srdeční. V lidovém léčitelství jsou olej, semena a sušená květenství používána při nemocech dýchacího traktu.

Světlice je medonosná rostlina, ale její med není příliš chutný a zapáchá. Získává se ve snůškově chudém pozdním létě.

Jak již bylo naznačeno dříve její semeno obsahuje i značné procento bílkovin, které se pohybuje okolo 35 % a 15–17 % bílkovin obsahují pokrutiny nebo extrahované šroty po zpracování loupaných nažek. A proto jsou nažky velmi oblíbené mezi chovateli zvířat, kteří je používají jako krmivo pro exotické ptactvo a nebo pro křečky apod. Drůbež a hospodářská zvířata jsou krmena pokrutinami a šroty.

Světlice je velmi odolná kulturní plodina, která také našla použití jako meziplodina na zelené hnojení.

Pro pestrou škálu barev, od bílé přes odstíny žluté, oranžové až po červenou, jakými oplývají květy světlice barvířské, se tato rostlina používá do suchých vazeb.

Pro svou odolnost je světlice barvířská použitelná také jako meziplodina na zelené hnojení nebo krmení. Světlici barvířskou lze vysévat také ve směskách.

V České republice jsou registrovány dvě odrůdy-Brněnka a Vierka.³²

Jedním ze zdrojů přírodních antioxidantů jsou i léčivé rostliny mezi nimiž je i jedna z důležitých aromatických a léčivých rostlin-světlice barvířská. Produkce přírodních látek v rostlinných tkáních je vysoce uspořádaný proces a mění se během vegetačního období. Proto je velmi důležité určení optimální doby sklizně a zjištění doby života rostliny k dosažení maximální produktivity rostliny jako potenciálního zdroje antioxidantů.

Byla vypracována studie, která zjišťovala závislost mezi antioxidačními účinky a obsahem fenolických látek v květech světlice v průběhu růstu rostliny. Pro tuto studii bylo vybráno vhodné rozpouštědlo (ethanol, aceton a methanol), které bylo použito k extrakci antioxidačních látek v různých etapách vývoje květů rostliny, které byly vyhodnocovány. Nakonec byly hodnoceny profily hlavních fenolických látek obsažených v květech světlice barvířské, které byly kvantifikovány a identifikovány během květenství. Bylo zjištěno, že složení extraktů závisí na druhu rostliny, části rostliny a technice extrakce. Byly sledovány profily hlavních šesti fenolických látek, které květ světlice obsahuje a změny všech sloučenin jsou různé v průběhu vývoje květu. Nejvíce zastoupená fenolická sloučenina je kyselina gallová, která představuje asi 102,57 ($\mu\text{g/g}$ suché hmoty).

Lineární korelace mezi kyselinou gallovou a antioxidační aktivitou během vývoje oranžových květů ukázala, že kyselina gallová je hlavní složka květů, která je zodpovědná za jejich antioxidační účinky a má nejvyšší antioxidační kapacitu mezi všemi testovanými fenolickými sloučeninami. Tato kyselina se používá jako přísada do potravin, aby se zabránilo jejich degradaci a zhoršení kvality potravin. Kyselina gallová má, jako většina polyfenolů, protizánětlivé, protirakovinné a antimutagenní účinky. Nebyla však nalezena žádná korelace mezi obsahem kyseliny chlorogenové a obsahem kyseliny syringové a antioxidačními účinky v extraktu z oranžových květů a fenolickými sloučeninami z žlutých a červených květů v průběhu tří etap vývoje květu. Tuto skutečnost lze vysvětlit mnoha způsoby. Fenoly nemusí obsahovat všechny antioxidanty a jejich činnost závisí převážně na jejich molekulární

strukturu. Ta závisí na dostupnosti fenolických vodíků a na možnosti stabilizace výsledných fenoxyl radikálů tvořených darovaným vodíkem.

Výsledky této studie tedy ukazují, že světlice barvířská je nejlepším přírodním zdrojem bioaktivních složek jako přírodních barviv v poslední vývojové etapě.³⁶

Bylo izolováno více než 200 sloučenin z *C. tinctorius* včetně flavonoidů, glykosidů fenylethanoidů, kumarinů, mastných kyselin, steroidů a polysacharidů.

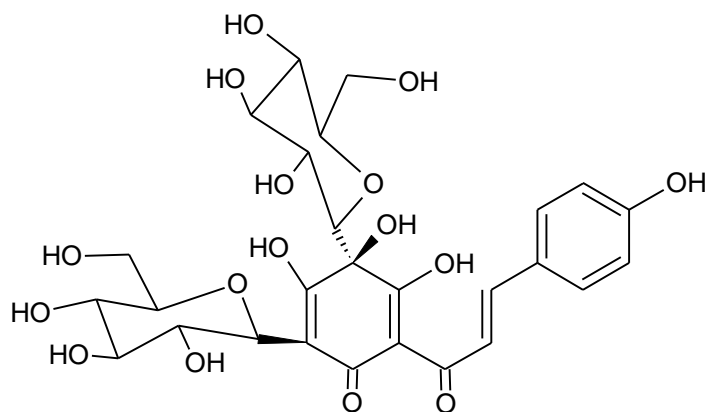
Flavonoidy se považují za aktivní součást mnoha léčivých bylin, které mají pozitivní účinky na lidské zdraví. Chalkonové flavonoidy jsou hlavní sloučeniny extrahovatelné do vody, jako HSYA, která je zodpovědná za hlavní léčebné účinky světlice barvířské. Také se ukázalo, že glykosidy 6-hydroxykaempferolu působí antiagregačním účinkem. Pro hodnocení kvality světlice se využívá kvantifikace těchto účinných sloučenin, proto má kvantifikace těchto látek velký význam.³⁷

2.3 Carthamin

Z květů světlice barvířské se z vodou vyluhovaných květů získává carthamin. Toto barvivo je dokonale rozpustné pouze v lihu. Protože žluté barvivo nemívá pro barvířské účely nikdy tak velký význam jako barvivo červené, bylo v mnohých zemích zvykem je proudem vody odstranit z květů a teprve takto „vyprané“ rostliny používat k výrobě carthaminu. Červeným carthaminem se barvívaly hedvábné a lněné látky a připravovala se z něj barevná lícidla.³⁸ Postup barvení světlicí na červenou je velice zdlouhavý, barvicí lázeň se připravuje za studena. V první fázi se získá jako vedlejší produkt velké množství kvalitního žlutého barviva. Červené barvivo ze světlice barvířské se používalo pouze k barvení bavlny a hedvábí, do vlny se nevstřebává. Pro barvení se používají jazykovité květy.³⁹

2.4 Hydroxysafflor yellow A

Struktura hydroxysafflor yellow A je zobrazena na následujícím obrázku:



Obr. 6: Struktura hydroxysafflor yellow A

Přesná hmota tohoto barviva je $M_r = 612,1690$

Květy rostliny světlice barvířské byly široce používány v tradiční čínské medicíně k léčbě kardiovaskulárních onemocnění. Extrakty přitahují velkou pozornost z důvodu celé řady biologických vlastností včetně protinádorových, imunodepresivních účinků spojených s chemopreventivními vlastnostmi. Navíc má silné protizánětlivé a antioxidační účinky. Extrakty obsahují několik různých pigmentů, jako jsou hydroxysafflor yellow A (zkráceně HSYA), safflorová žluť B (SYB), safflomin A, safflomin C a další pigmenty. Mezi těmito pigmenty je HSYA hlavní aktivní chemickou složkou světlice barvířské a má nejvyšší rozpustnost ve vodě. Bylo prokázáno, že HSYA v čisté chemické podobě má dobré léčebné účinky.⁴⁰

Tradiční čínská medicína používá HSYA primárně při nemocech jater a srdce. V malých dávkách pomáhá oživení krevního oběhu a ve vyšších dávkách zbavuje krevních sraženin. Při problémech srdečně – cévního systému, kde mírně stimuluje srdce, snižuje odpor věnčitých tepen, zlepšuje krevní oběh a průtok (zejména u srdečního svalu a poskytuje výživu srdečního svalu). Působí proti agregaci krevních destiček a tím zabraňuje tvorbě trombózy. U těhotných žen může v malém množství zvýšit rytmické kontrakce dělohy, naopak velké množství způsobuje sevření a křeče. Dále poskytuje ochranu pro mozek v případě nedostatku kyslíku a používá se jako diuretikum. Má analgetické, protiplísňové a antibakteriální účinky.

Dále je v této medicíně používána při střevních problémech, některých fázích léčby u vředových chorob (zejména počáteční), bolestech po zranění nárazem (otoky a modřiny), revmatoidní artritidě, poruchách menstruace (podporuje menstruaci, tlumí bolesti při menstruaci v důsledku absence menstruace), při onemocnění spalničkami, při zvětšení jater a sleziny, onemocnění průdušek a horních cest dýchacích, při problémech s vykašláváním a při některých nádorových onemocněních. Velmi ceněná je ale především při problémech s angínou pectoris a ischemickou chorobou srdeční.⁴¹

Bylo zjištěno, že HSYA má ochranný účinek na mozek a nervovou soustavu v případě reperfuse po ischemické příhodě.^{42, 43, 44, 45, 46, 47} Mechanismem je pravděpodobně antioxidační působení⁴⁷, respektive potlačení tvorby trombinu a zánětlivé odezvy.⁴³

Byl sestaven přehled *in vitro* a *in vivo* neuroprotektivních efektů HSYA.⁴⁸ V jiné studii prováděné na krysách bylo zjištěno, že HSYA chrání neurony před poškozením hypoxií a potlačují zánětlivou odezvu na ischemickou reperfuzi.^{48, 49}

Hydroxysafflor yellow A vykazuje ochranný efekt i v případě ischemie a reperfuse v srdci.^{50, 51, 52}

Bylo prokázáno, že HSYA snižuje u krys velikost postižení infarktem myokardu.⁵³ Pravděpodobně inhibičním účinkem na apoptózu srdečních myocytů při infarktu.⁵⁴ Bylo zjištěno, že světlice má i protinádorové účinky.⁵⁵

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

- Methanol (Fisher Chem., HPLC grade)
- Deionizovaná voda (Lach:ner, Water for HPLC)
- Acetonitril (J.T.Baker, HPLC, gradient grade)
- Kyselina mravenčí (Sigma life Science , 99,7 %)
- Standard: hydroxysafflor yellow A (Carbosynth Ltd.,)
- Standard: leucin- enkefalin (Leu-Enk, Sigma life Science, ≥ 95 % (HPLC))

3.2 Vzorky

- sušené květy Světlice barvířské (objednáno z internetu)
- JOJO Hraj si! ABECEDA – žvýkácké bonbóny (Nestlé Česko s.r.o.)
- Sunárek instantní nápoj s příchutí pomeranče (Artifex Instant s.r.o.)

3.3 Instrumentace a metody

- ultra-účinný kapalinový chromatograf (UPLC, Acquity, Waters)
- hmotnostní spektrometr (Q-ToF Premier, Waters) s ionizací elektrosprejem a hybridním analyzátozem Q-ToF
- chromatografická kolona (Kinetex 2,6 μm - C18 (50 x 2,1 mm))

Připravili jsme si roztok standardu HSYA o koncentraci 100 ng/ml a na tento standard jsme optimalizovali parametry iontového zdroje, tedy elektrospreje, s ohledem na jeho citlivost. Optimalizovali jsme tyto parametry : napětí spreje, teplotu zdroje, teplotu desolvatace, průtok desolvatačního plynu a napětí na vstupní štěrbině. Zaváděli jsme 5 µl/min 100 ng/ml HSYA s 0.6ml/min 7 % ACN ve vodě a 0.1 HCOOH, které byly míseny v T spojce (bez kolony).

Elektrosprejový iontový zdroj byl provozován v záporném režimu ionizace.

Sprejovací napětí bylo optimalizováno v rozmezí od 1,5 kV do 3,5 kV a vybráno bylo napětí 3 kV.

Napětí na vstupní štěrbině (sampling cone) bylo optimalizováno v rozmezí 20 V–50 V a vybráno bylo napětí 45 V.

Teplota ve zdroji byla optimalizována v rozmezí 80 °C–120 °C a vybrána byla teplota 100 °C.

Teplota desolvatace byla optimalizována v rozmezí 250 °C–450 °C a vybrána byla teplota 400 °C.

Průtok desolvatačního plynu byl optimalizován v rozmezí 400 l/hod–800 l/hod a vybrán byl průtok 700 l/hod.

V metodě, kterou jsme používali pro všechna měření jsme pracovali s časově proměnným složením mobilní fáze, tedy s gradientovou elucí a měla tyto parametry: průtok 0,6ml/min, dva zásobníky mobilní fáze A: 0.1 % kyselina mravenčí ve vodě a B: 0.1 % kyselina mravenčí v acetonitrilu, složení mobilní fáze se měnilo následovně:

Tab. IV: Mobilní fáze s gradientovou elucí

Čas (min)	A%	B%
	93	7
2	93	7
3	30	70
3,3	93	7
3,5	93	7

Během každého měření byl T spojkou přiváděn standard Leu -Enk o koncentraci 100 µg/ml průtokovou rychlostí 0,5 µl/min. U této metody jsme stanovily tyto tři parametry opakovatelnost, reprodukovatelnost a mez detekce.

Před identifikací HSYA ve vzorcích byla hmotnostní škála přístroje kalibrována pomocí klastrů mravenčanu sodného.

Kvantifikace HSYA byla provedena metodou kalibrační křivky. Roztoky na kalibrační křivku jsme si připravili postupným ředěním z roztoku standardu HSYA, který byl připraven rozpuštěním navážky 0,00138 g standardu ve vodě na jeho konečnou koncentraci 1mg/ml. Z tohoto roztoku jsme si dále připravili roztoky a koncentracích 30 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml, 1000 ng/ml a 3000 ng/ml. Každý z těchto roztoků byl třikrát proměřen výše popsanou metodou.

Mezidenní reprodukovatelnost metody jsme měřili ve třech po sobě následujících dnech a intradenní reprodukovatelnost jsme měřili třikrát v jednom dni. Měřili jsme dvě koncentrace standardů HSYA a to 300 ng/ml a 3000 ng/ml. Každou koncentraci jsme proměřili šestkrát v jednom dni.

Opakovatelnost byla vyhodnocena ze šesti bezprostředně po sobě jdoucích měření. Měřili jsme standard HSYA o koncentracích 300 ng/ml a 3000 ng/ml.

Mez detekce jsme měřili na sérii standardů o koncentracích 10ng/ml, 30 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml, 1000 ng/ml, 3000 ng/ml a 10000 ng/ml výše popsanou metodou.

Dále jsme proměřili vzorek Sunárku (Sunárek instantní dětský nápoj s příchutí pomeranče). U toho jsme postupovali následovně: navážili jsme si 0,10531 g Sunárku a rozpustili jej v 1 ml vody. Připravili jsme si kolonku (Waters OASIS s 30 mg sorbentu, HLB) pro SPE (extrakcí pevnou fází jsme odstranili rušivou matici), kterou jsme kondicionovali 1 ml methanolu, 1 ml vody a poté nanесли 1 ml vzorku Sunárku, kde se barevná frakce zachytila v sorbentu. Sorbent byl dále promyt 1 ml vody a 1 ml methanolu bylo barvivo vyextrahováno ze sorbentu do vialky, kde byl methanol odpařen do sucha a zbytek byl rozpuštěn v 1 ml vody a proměřen výše popsanou metodou. Byl proměřen i extrakt Sunárku v methanolu (bez odpaření extraktu a rozpuštění v vodě), ale pík byl rozmytý (široký a nesouměrný), když jsme methanolickeý extrakt vysušili a nahradili jej vodou a vzorek znovu proměřili byl pík souměrný a vysoký.

Roztok JOJO bonbónů ABECEDA jsme připravili následovně: zvážili jsme si dva bonbóny žlutý a červený (v něm HSYA nebylo nalezeno, proto se jím dále nebudeme zabývat), žlutý bonbón vážil 2,41632 g, ten jsme nakrájeli na malé kousky a v třetí misce rozetřeli s 5 ml vody, poté jsme tuto směs kvantitativně převedli 20 ml vody do kádinky,

kteřou jsme nechali po dobu 20 min v ultrazvuku a zahříváli jsme na teplotu 70 °C, kde se bonbón zcela rozpustil. Z tohoto roztoku jsme odpipetovali 1 ml k vlastní analýze. Tento 1 ml roztoku jsme podrobili SPE, stejně jako u Sunárku, a následnému vysušení methanolu dusíkem. Zbytek po vysušení jsme rozpustili v 1 ml vody a tento roztok jsme analyzovali.

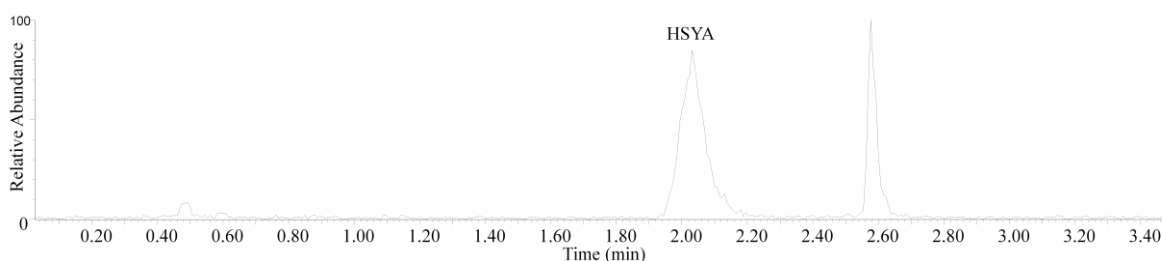
Nakonec jsme měřili extrakt z květů světlice barvířské. Navázili jsme 0,10031 g květů světlice barvířské a rozetřely v třecí misce. Prášek z květů jsme kvantitativně převedly do kádinky s 10 ml vody a nechali 20 minut extrahovat v ultrazvuku při teplotě 80 °C. Poté jsme nechali extrakt odstředit v centrifuze po dobu 10 minut při 140 otáčkách. Supernatant jsme nejdříve 100krát naředili a poté proměřili výše popsanou metodou a sediment znovu použili k reextrakci. Tento postup byl opakován dvakrát. Získali jsme tedy 3 extrakty.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

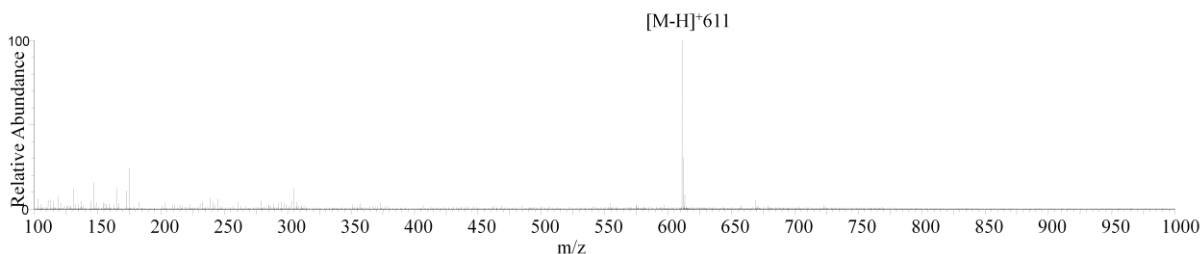
Základem pro kvantitativní vyhodnocování byla korigovaná intenzita píku HSYA, tj. poměr intenzit píků HSYA (m/z 611) a Leu-Enk (m/z 554) v součtovém spektru vzniklém sčítáním všech skenů v oblasti chromatografického píku HSYA.

Intenzita píku 554 byla vypočtena jako podíl intenzity píku v součtovém spektru a počtu skenů zahrnutých v součtovém spektru.

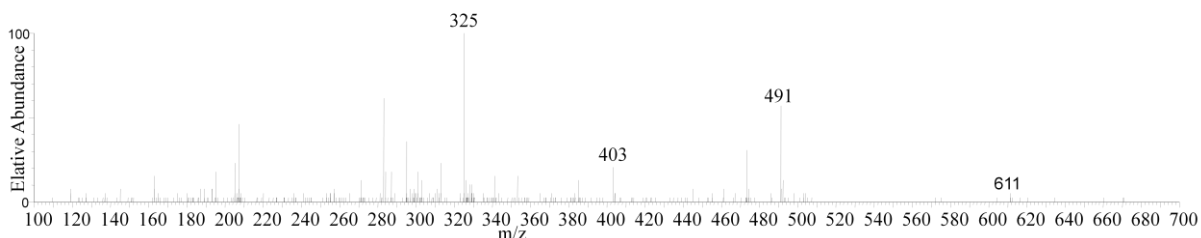
Rekonstruovaný iontový chromatogram a spektra standardu HSYA jsou na následujících obrázcích:



Obr. 7: Rekonstruovaný iontový chromatogram HSYA (m/z 611) standardu HSYA



Obr. 8: MS spektrum zprůměrované z chromatografické separace standardu HSYA v retenčním čase 2,00-2,20 min



Obr. 9: MS/MS spektrum iontu (m/z 611) v retenčním čase 2,00-2,20 min standardu HSYA

4.1 Opakovatelnost a reprodukovatelnost

Opakovatelnost a reprodukovatelnost byly vyhodnocovány z šesti po sobě jdoucích měření, v případě reprodukovatelnosti (intradenní) opakovaných třikrát během jednoho dne resp. během tří různých dnů (mezidenní).

Získané hodnoty jsme otestovali Q-testem (Dean-Dixonovým testem) na hladině významnosti $\alpha=0,05$. Dean-Dixonův test slouží jako test pro vylučování odlehlých výsledků. Žádná ze získaných hodnot nebyla odlehlá.

Všechny tři dvojice průměrů ze šesti měření u intradenní i mezidenní reprodukovatelnosti jsme otestovali Studentovým t-testem shodnosti aritmetických průměrů, všechny dvojice byly vyhodnoceny jako shodné.

Měření mezidenní reprodukovatelnosti

c = 300 ng/ml	c = 3000 ng/ml
- RSD = 30,0 %	- RSD = 23,5 %

Měření intradenní reprodukovatelnosti

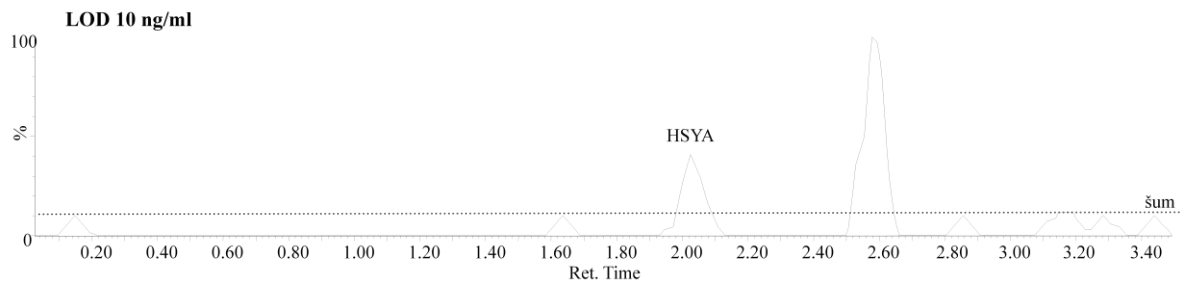
c = 300 ng/ml	c = 3000 ng/ml
- RSD = 20,5 %	- RSD = 32,9 %

Měření opakovatelnosti

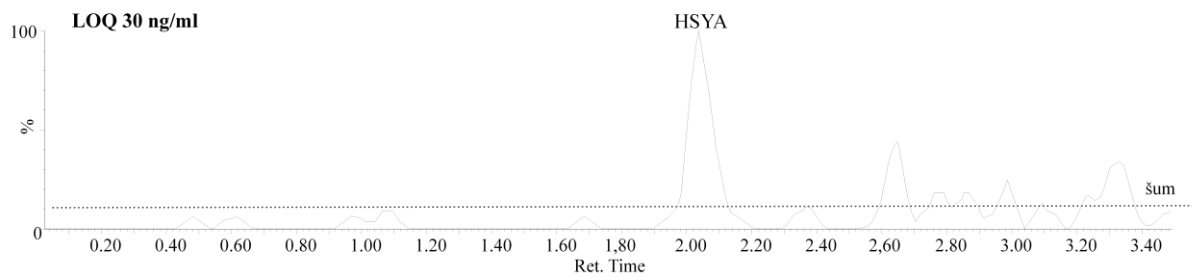
c = 300 ng/ml	c = 3000 ng/ml
- RSD = 19,3 %	- RSD = 12,8 %

4.2 Mez detekce a stanovitelnosti

- mez detekce a stanovitelnosti jsme určili vizuálně jako koncentraci kalibrantu, který poskytl poměr signálu kalibrantu a šumu vyšší než 3, (respektive 10)
- mez detekce je 10 ng/ml
- mez stanovitelnosti je 30 ng/ml

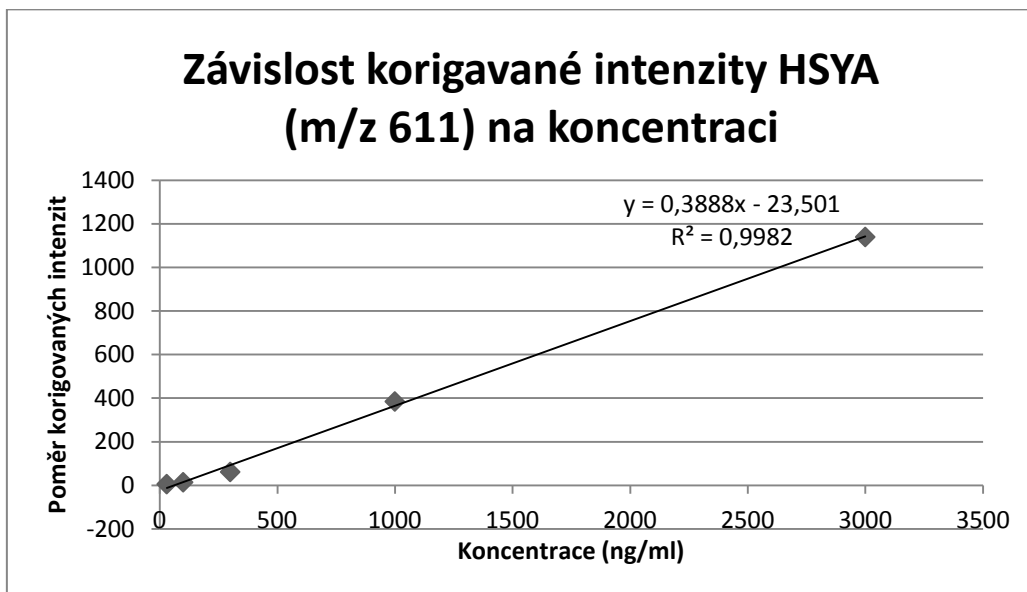


Obr. 10: Mez detekce



Obr. 11: Mez stanovitelnosti

4.3 Kalibrační křivka



Obr. 12: Závislost korigované intenzity HSYA (m/z 611) na koncentraci

4.3.1 Stanovení koncentrace HSYA v Sunárku

Výpočet koncentrace Sunárku z rovnice regrese kalibrační přímky:

- rovnice regrese: $y = 0,3888x - 23,501$
- průměrná korigovaná intenzita iontu m/z 611 poměru píků z měření Sunárku : 880,41 (RSD 24 %)

$$880,41 = 0,3888x - 23,501$$

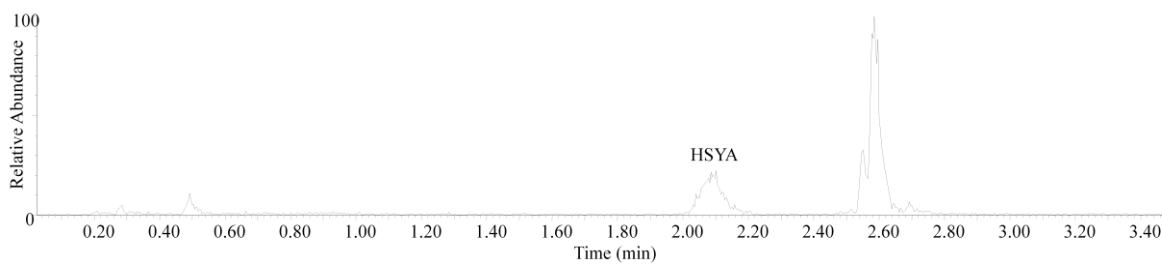
$$X_{\text{Sunárku}} = 2324,87 \text{ ng/ml}$$

- přepočítání koncentrace na ppm (= $\mu\text{g/g}$)

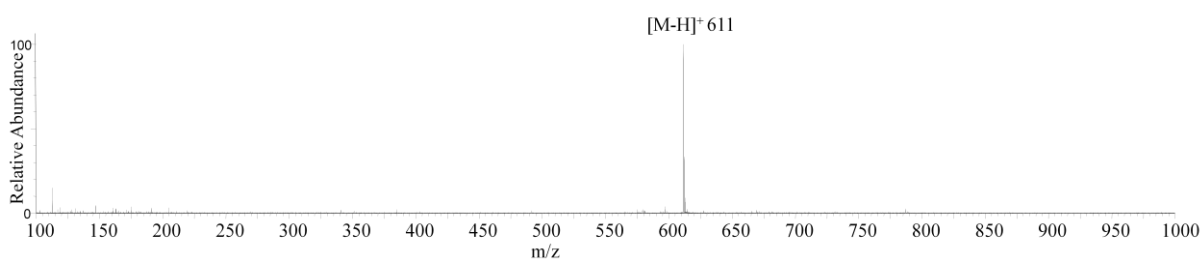
$$2,32487 \dots\dots\dots 0,10531 \text{ g}$$

$$\underline{x \dots\dots\dots 1 \text{ g}}$$

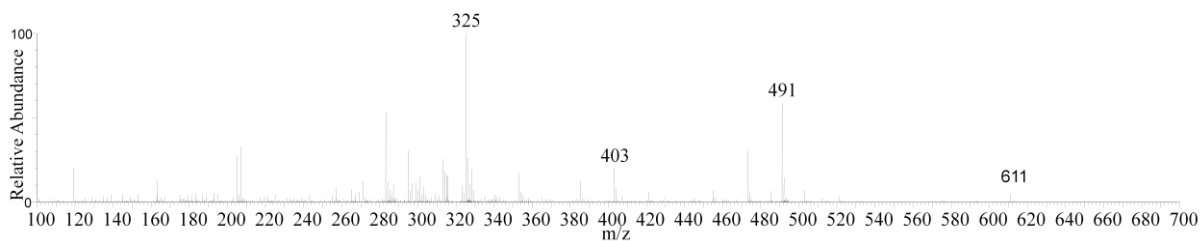
$$x = 22 \pm 5,28 \text{ ppm}$$



Obr. 13: Rekonstruovaný iontový chromatogram HSYA (m/z 611) extraktu ze Sunárku



Obr. 14: MS spektrum zprůměrované z chromatografické separace v retenčním čase 2,00-2,20 min extraktu ze Sunárku



Obr. 15: MS/MS spektrum iontu (m/z 611) v retenčním čase 2,00-2,20 min extraktu ze Sunárku

4.3.2 Stanovení obsahu HSYA ve žvýkacích bonbónech JOJO ABECEDA

Výpočet obsahu HSYA v JOJO bonbónech ABECEDA z rovnice regrese kalibrační přímky:

- rovnice regrese: $y = 0,3888x - 23,501$
- průměrná korigovaná intenzita iontu m/z 611 z měření JOJO bonbónů ABECEDA: 623,45 (RSD 14 %)

$$623,45 = 0,3888x - 23,501$$

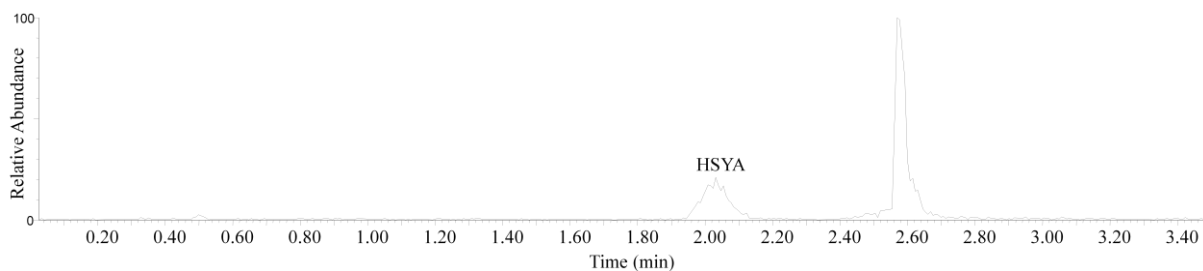
$$X_{\text{JOJO bonbóny}} = 1663,97 \text{ ng/ml} = 1,66397 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

- 25ml roztoku extraktu tedy obsahuje 41,60 μg HSYA
- přepočet koncentrace na ppm (= $\mu\text{g/g}$)

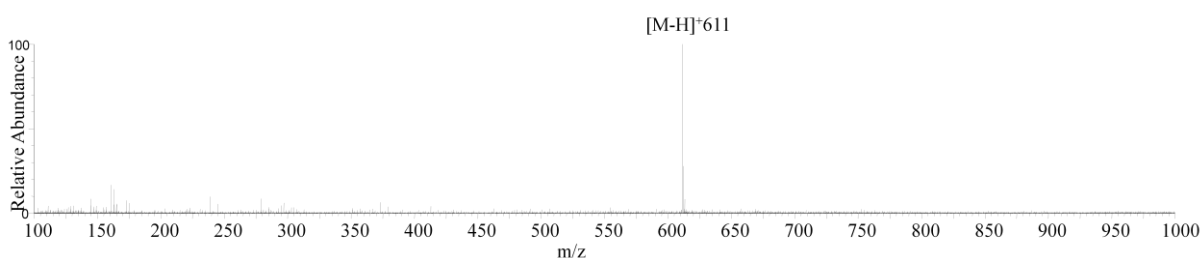
$$41,60 \dots\dots\dots 2,41632 \text{ g}$$

$$\underline{x \dots\dots\dots 1 \text{ g}}$$

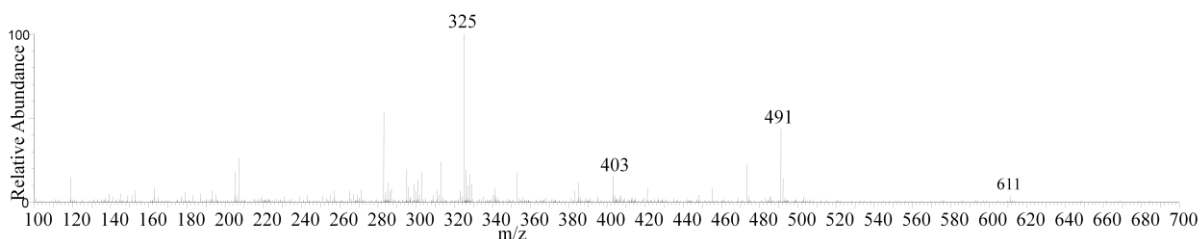
$$x = 17 \pm 2,38 \text{ ppm}$$



Obr. 16: Rekonstruovaný iontový chromatogram HSYA (m/z 611) bonbónů JOJO ABECEDA



Obr. 17: MS spektrum zprůměrované z chromatografické separace v retenčním čase 2,00-2,20 min bonbónů JOJO ABECEDA



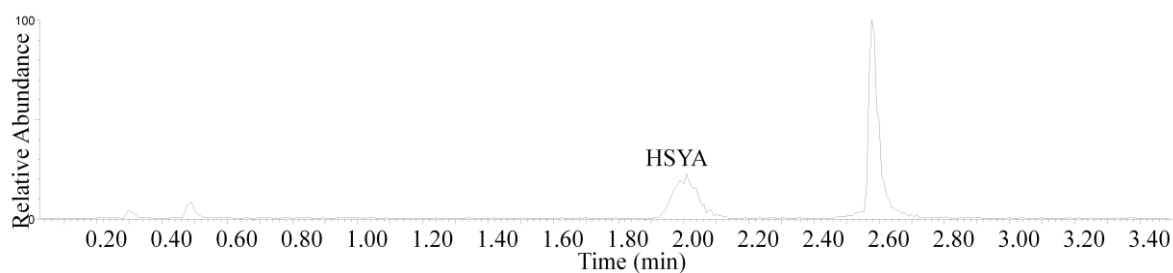
Obr. 18: MS/MS spektrum iontu (m/z 611) v retenčním čase 2,00-2,20 min ve vzorku bonbónů JOJO ABECEDA

4.3.3 Stanovení koncentrace HSYA ve vysušených květech světlice barvířské

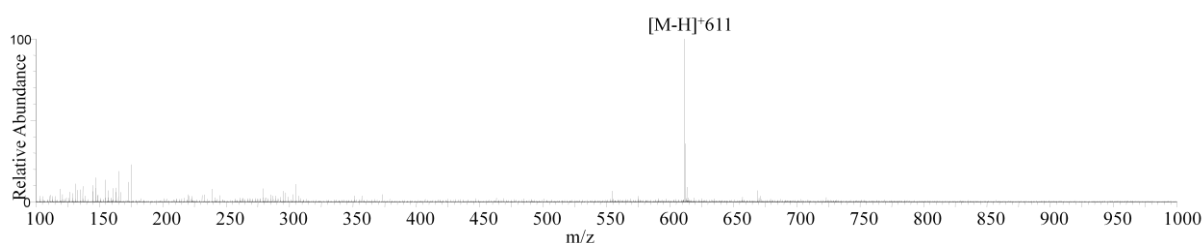
Výpočet obsahu HSYA v extraktu světlice z rovnice regrese kalibrační přímky:

- rovnice regrese: $y = 0,3888x - 23,501$
- průměrná korigovaná intenzita iontu m/z 611 z měření:
extraktu 1 = 588,43 (RSD 16 %)
extraktu 2 = 80,65
extraktu 3 = 9,42
- ukázka výpočtu pro extrakt 1:
$$588,43 = 0,3888x - 23,501$$
$$x_{\text{extrakt1}} = 1574 \text{ ng/ml} = 1,574 \text{ } \mu\text{g/ml}$$
- vzorek byl 100x ředěn, v původním vzorku byla tedy koncentrace 157,4 $\mu\text{g/ml}$, deset mililitrů extraktu tedy obsahuje 1574 μg HSYA
$$1574 \mu\text{g} \dots\dots\dots 0,10031 \text{ g}$$
$$\underline{x \dots\dots\dots 1 \text{ g}}$$
$$x_{\text{květy}} = 15691 \text{ ppm}$$
- obdobně jsme postupovali pro výpočet u extraktu 1 a extraktu 2:
 $x_{\text{extrakt2}} = 2670 \text{ ppm}$
 $x_{\text{extrakt3}} = 683 \text{ ppm}$
- pro zjištění průměrného korigovaného množství HSYA v květech světlice barvířské jsme všechny tři hodnoty sečetli:
$$x_{\text{celkovéHSYA}} = x_{\text{extrakt1}} + x_{\text{extrakt2}} + x_{\text{extrakt3}} = 15691 + 2670 + 683 = 19044 \pm 3047 \text{ ppm}$$

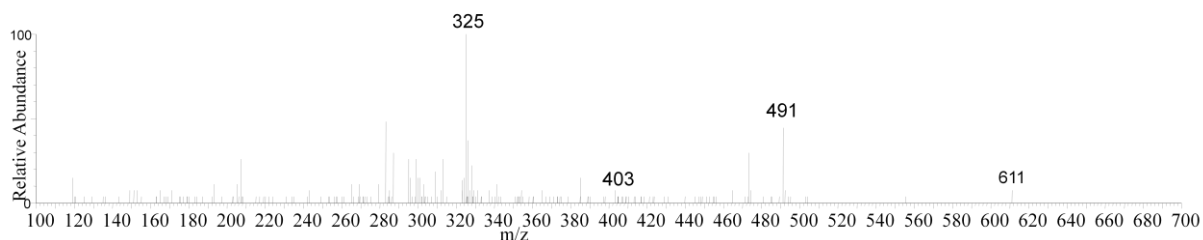
Můžeme tedy konstatovat, že květy světlice barvířské obsahují asi 19000 ppm, tedy 1,9 % (m/m) barviva hydroxysafflor yellow A.



Obr. 19: Rekonstruovaný iontový chromatogram HSYA (m/z 611) extraktu z květů světlice barvířské



Obr. 20: MS spektrum zprůměrované z chromatografické separace v retenčním čase 2,00-2,20 min extraktu z květů světlice barvířské

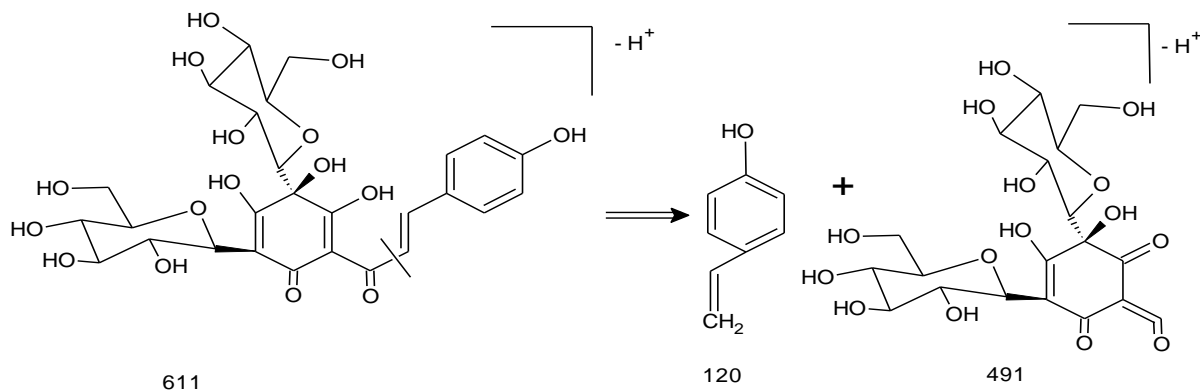


Obr. 21: MS/MS spektrum iontu (m/z 611) v retenčním čase 2,00-2,20 min extraktu z květů světlice barvířské

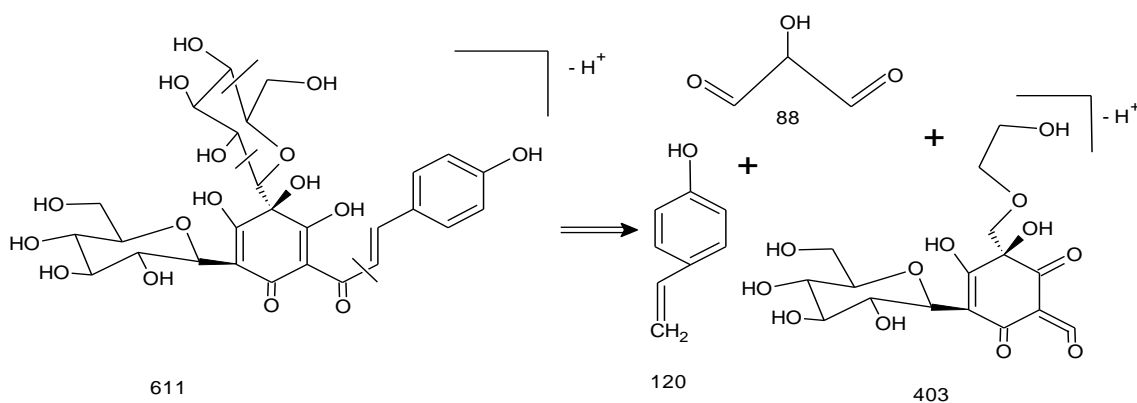
4.4 Kolizní indukovaná disociace hydroxysafflor yellow A

Navrhovaný průběh kolizí indukované disociace HSYA v záporném režimu:

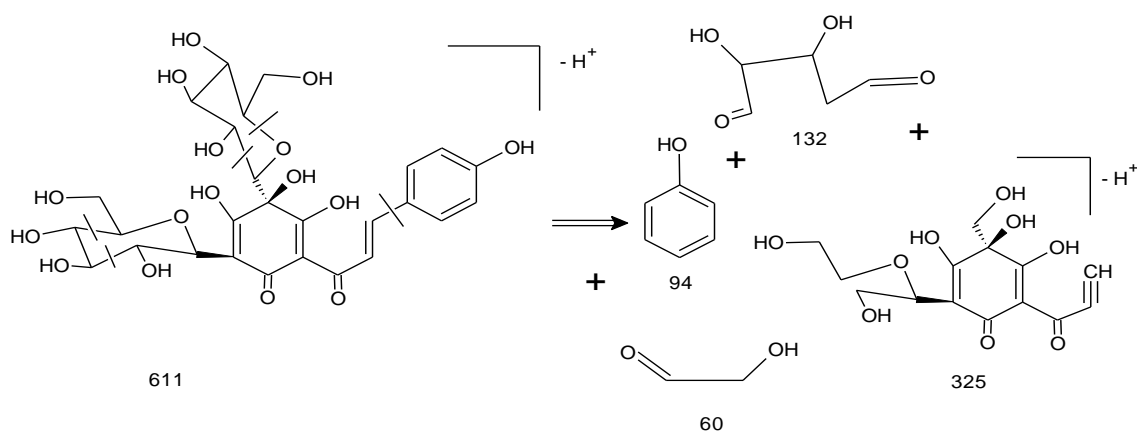
Fragmentace iontu m/z 611:



Obr. 22: Vznik fragmentu 491



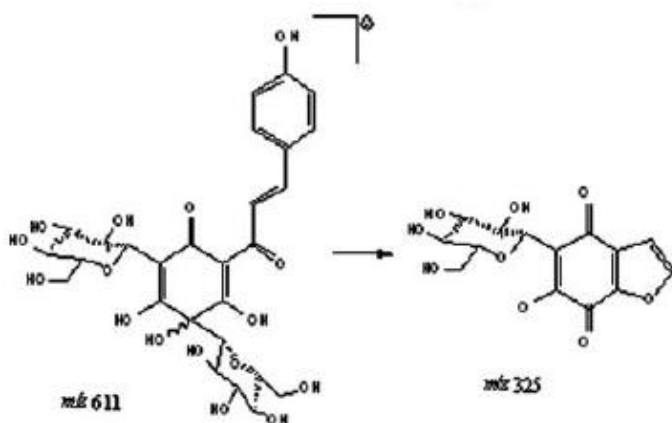
Obr. 23: Vznik fragmentu 403



Obr. 24: Vznik fragmentu 325

Spektrum standardu HSYA je uvedeno na obrázku č. 15

Studie, která se zabývá stanovením HSYA v krevní plazmě navrhuje tuto fragmentaci:



Obr. 25: Vznik molekulárního iontu m/z 325. Převzato z literatury ⁵⁶.

Tento způsob kolizní indukované disociace se liší od námi navrhované fragmentace pro vznik iontu m/z 325.

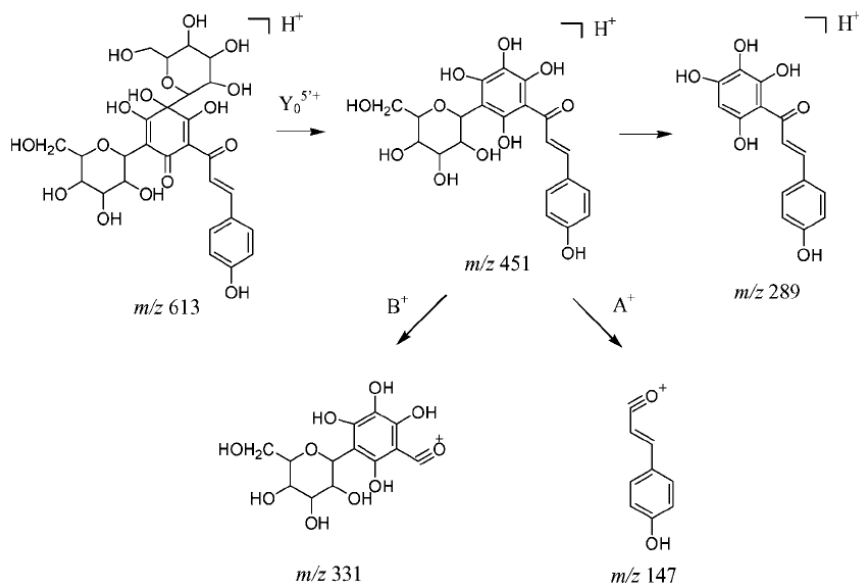
Další studie používaná pro charakterizaci C-glykosilovaných chinochalkonů v *Carthamus tinctorius* L. navrhuje dvě cesty, jak by se mohla fragmentovat HSYA. První fragmentační cesta se týká přerušení C-C vazby mezi HSYA a glukosou, kde glukosa se odštěpuje jako neutrální zbytek. Obecně platí, že pro C-glykosidy je těžké odtrhnout cukerný zbytek z důvodu stability C-C vazby, proto odtržení cukerného zbytku je spíše charakteristické pro O-glykosidy. Nicméně, fragmentace "hydroxysafflor yellow A" v pozitivním módu produkuje základní iont při m/z 451 namísto charakteristických fragmentů produkovaných vnitřním štěpením cukerné jednotky C-glykosyl flavonoidů.

Kazuno a kol. vypracovali studii fragmentace HSYA 3'-C-glykosyl dihydrochalkonu. Přesné měření hmoty iontu také potvrdilo tento druh fragmentace. Elementární struktura iontu m/z 451 bylo $C_{21}H_{23}O_{11}$, takže molekula HSYA odštěpila neutrální zbytek $C_6H_{10}O_5$, který odpovídá ztrátě 5'-glukosy. Následně dojde k odtržení 3'-glukosy což má za následek vznik iontu m/z 285.

Další fragmentace, která byla popsána v této studii je přerušení vazby vedle karbonylové skupiny, kterým se získají ionty A^+ a B^+ v pozitivním módu.

Stejný iontový fragment s hodnotou m/z 147 vznikl z A^+ iontu. Ionty z B^+ se jeden od druhého liší vlivem substituentu v poloze 3'. Úspěšná fragmentace B^+ dává informaci o substituentu který je v poloze 3'.

Tato fragmentace je popsána na následujícím obrázku:



Obr. 26: Fragmentace HSYA v pozitivním módu. Převzato z literatury ⁵⁷.

4.5 Srovnání vyvinuté metody s metodami popsány v literatuře

V literatuře je popsána metoda LC-MS-MS pro stanovení HSYA v krevní plazmě psů plemene beagle a má tyto parametry: jako mobilní fáze se používá metanol – acetonitril – 0,5 % kyselina mravenčí v poměru 20:25:55 (v/v) a její průtok je 1 ml/min s gradientovou elucí, analyzovaná směs se dělí na koloně C₁₈ 250 x 4.6 mm a obsahuje částice o průměru 5- μ m. Nastříkovaný objem byl 10 μ l vzorku, kde byla odstraněna rušivá matrice na SPE (Waters Oasis HLB extraction cartridges (60 mg, 3 ml)). Délka analýzy byla 11 minut. Reprodukovatelnost této metody při koncentraci 200 ng/ml je 5 % a mez stanovitelnosti je 10 ng/ml.⁵⁸

Další literaturou popsaná metoda je metoda UPLC/ Q-TOF MS, která se používá pro charakterizaci C-glykosilovaných chinochalkonů v *Carthamus tinctorius* L.. V této metodě se analyzuje standard HSYA s vodou extrahovatelnými složkami ze světlice barvířské v kladném i záporném módu. Mobilní fáze se skládala z vody a acetonitrilu: v obou bylo 0,1 % (v/v) kyseliny mravenčí. Mobilní fáze byla dávkována s gradientem 5 % B do 24 % B (20 min), a 24 % B do 40 % B (10 min). Průtok mobilní fáze byl 0,25 ml/min. Byla zde použita kolona o rozměrech 100 x 2,1 mm, která obsahovala částice o průměru 1,7 μ m.⁵⁷

Další metoda se týká stanovení HSYA v lidské plasmě metodou LC-MS/MS. V této studii se pracovalo s gradientovou elucí mobilní fáze složené z methanolu a 5mM octanu amonného (80:20, v/v) a průtokem mobilní fáze byl 0,4 ml/min. Kolona měla tyto parametry C₁₈ (150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) . Nastříkovaný objem byl 10 μ l. Tato metoda má nejkratší dobu analýzy z uvedených tří metod a to 5,5 minut. Mez stanovitelnosti je 1 ng/ml a reprodukovatelnost této metody je 9,2 %.⁵⁶

Porovnáním vyvinuté metody s literaturou popsány metodami lze jako velkou výhodou uvést dobu analýzy, která u této metody byla nejkratší a sice 3,5 minuty.

5. ZÁVĚR

V této bakalářské práci lze nalézt obecný přehled jedné z nejvíce zkoumané a rozšířené skupiny látek polyfenolů. Tato skupina látek nabízí širokou škálu pozitivních účinků na lidské zdraví, což v dnešní době, plné nemocí a nekvalitních potravin, představuje neocenitelný zdroj naděje na zdravý život. Proto i tato práce se věnovala problematice týkající se polyfenolických látek. Rostlinný materiál, který sloužil jako zdroj polyfenolických látek pro tuto práci byla světlice barvířská, obsahující jako jednu z majoritních složek chalkonové barvivo hydroxysafflor yellow A. Prospěšné účinky výtažku ze světlice barvířské připisované tradiční čínskou medicínou jsou v současné době předmětem intenzivního výzkumu i klasické medicíny.

Pomocí spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie byl stanoven obsah hydroxysafflor yellow A, vodou extrahovatelné složky, v květech světlice barvířské. Pomocí metody kalibrační křivky byl stanoven obsah 1,9 % hydroxysafflor yellow A.

Pro ověření použitelnosti byl hledán na trhu dostupný produkt s obsahem HSYA. Byly nalezeny produkty ve kterých byl deklarován obsah HSYA: Sunárek, Bonpari a JOJO bonbóny ABECEDA. Přítomnost HSYA v Sunárku, bonbónech JOJO ABECEDA a květech světlice barvířské jsme potvrdili na základě srovnání MS/MS spekter se standardem HSYA. I přes výrobcem deklarovaný obsah HSYA se nepodařilo detekovat toto barvivo v Bonparech. Hydroxysafflor yellow A byl stanoven v instantním dětském čaji Sunárku s příchutí pomeranče a žlutých JOJO bonbónech ABECEDA, v nichž světlice barvířská slouží jako přírodní barvivo. V Sunárku byl stanoven obsah 22 ppm hydroxysafflor yellow A a v JOJO bonbónech ABECEDA 17 ppm.

6. LITERATURA

1. Bravo L.: Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*, **5**, 317-333 (1998).
2. Yang Z., Yang J., Jia Y., Tian T., Wen A.: Pharmacokinetic properties of hydroxysafflor yellow A in healthy Chinese female volunteers. *Journal of Ethnopharmacology*, **124**, 635–638 (2009).
3. Zhang Y., Guo J., Dong H., Zhao X., Zhou L., Li X., Liu J., Niu Y.: Hydroxysafflor yellow A protects against chronic carbon tetrachloride-induced liver fibrosis. *European Journal of Pharmacology*, **660**, 438–444 (2011).
4. Shan L., Ma S., Qiu X., Zhou Y., Zhang Y., Zheng L., Peng-cheng R., Wang Y., Fan Q., Ma B.: Hydroxysafflor Yellow A protects spinal cords from ischemia/reperfusion injury in rabbits. *BMC Neuroscience*, **11**, 98 (2010).
5. Rechner A., Kuhnle G., Bremner P., Hubbard G., Kevin P., Moore R.-E.: The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free radic. Biol.Med.*, **33**, 220–235, (2002).
6. Q. Yang, Z.-F. Yang, S.-B. Liu, X.-N. Zhang, Y. Hou, X.-Q. Li, Y.-M. Wu, A.-D. Wen, Zhao M.-G.: Neuroprotective Effects of Hydroxysafflor Yellow A Against Excitotoxic Neuronal Death Partially Through Down-Regulation of NR2B-Containing NMDA Receptors, *Neurochem Res*, **35**, 1353–1360 (2010).
7. Kuhnau J.: The flavonoids: a class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet*, **24**, 117-191 (1976).
8. Sun Ch.-Y., Pei Ch.-G., Zang B.-X., Wang L., Jin M.: The Ability of Hydroxysafflor Yellow A to Attenuate Lipopolysaccharide-induced Pulmonary Inflammatory Injury in Mice. *Phytother. Res*, **24**, 1788–1795 (2010).
9. Jung H.: Forage lignins and their effects on fiber digestibility. *Agron J*, **81**, 33-38 (1989).

10. Wallace G., Chesson A., Lomax J.-A., Jarvis M.-C.: Lignin- carbohydrate complexes in graminaceous cell walls in relation to digestibility. *Anim Feed Sci Tech*, **32**, 1993-1999 (1991).
11. Herrmann H.: On the occurrence of flavonol and flavone glycosides in vegetables. *Z Lebensm Unters Forsch*, **186**, 1-5 (1988).
12. Mazza G.: Anthocyanins in grapes and grape products. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **35**, 341-371 (1995).
13. Wursch S., Rosset J., Smiley M.: The tannin granules from ripe carob pod. *Lebens Wiss Technol*, **17**, 351-354 (1984).
14. Peleg H., Naim M., Rouseff R.-L., Zehavi U.: Distribution of bound and free phenolic acid in oranges (*Citrus sinensis*) and grapefruits (*Citrus paradisi*). *J Sci Food Agric*, **57**, 417-426 (1991).
15. Harborne J.-B.: Methods in plant biochemistry in plant phenolics. *Academic Press*, **4**, 389-419 (1989).
16. Dangles O., Dufour C.: Recent Advances on Polyphenol Research. *Wiley-Blackwell*, **1**, 67 – 87 (2008).
17. Wojdyło A, Oszmian´Ski J., Laskowski P.: Polyphenolic Compounds and Antioxidant Activity of New and Old Apple Varieties. *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 6520–6530 (2008).
18. Michotte D., Rogez H., Chirinos R., Mignolet E., Campos D., Larondelle Y.: Linseed oil stabilisation with pure natural phenolic compounds, *Food Chemistry*, **129**, 1228–1231 (2011).
19. Griffiths L.-A., Barrow A.: Metabolism of flavonoid compounds in germ-free rats. *Biochem J.*, **130**, 1161-1162 (1972).

20. Lihong F.-L., Xiaoqian D.-X., Shi Z., Zhang Ch., Wang K.: Hydroxysafflor Yellow A Protects PC12 Cells Against the Apoptosis Induced by Oxygen and Glucose Deprivation. *Cell Mol Neurobiol*, **31**, 1187–1194 (2011).
21. Ye S.-Y., Gao W.-Y.: Hydroxysafflor Yellow A Protects Neuron Against Hypoxia Injury and Suppresses Inflammatory Responses Following Focal Ischemia Reperfusion in Rats. *Arch Pharm Res*, **31**, 1010-1015 (2008).
22. King R.-A., Broadbent J.-L., Head R.-J.: Absorption of the soy isoflavone genistein in rats. *J Nutr*, **126**, 176-82 (1996).
23. Buchanan C.-J., Wallace G., Fry S.-C., Eastwood M.-A.: In vivo release of ¹⁴C-labeled phenolic groups from intact dietary spinach cell walls during passage through the rat intestine. *J Sci Food Agri*, **71**, 459-469 (1996).
24. Lee M.-J., Wang Z.-V., Li H.: Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **4**, 393-399 (1995).
25. Manach C., Morand C., Demigne C.: Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *FEBS Lett*, **409**, 12-6 (1997).
26. Levrat A.-M., Texier O., Regeat F.: Comparison of the effects of condensed tannin and pectin on cecal fermentations and lipid metabolism in the rat. *Nutr Re*, **13**, 427-433 (1993).
27. Mafias E., Lebet V., Arrigoni E., Amado R., Malkki Y., Cummings J.-H.: In vitro studies of polyphenol fermentability. Dietary fibre and fermentation in the colon. *Office for Official Publications of the European Communities*, **92**, 186-190 (1996).
28. Hung W.-L., Huang Ch., Wang M.-H.: Chemical composition, nutritional value, and antioxidant constituents of *Kalopanax pictus* leaves. *Food Chemistry*, **131**, 449–455 (2012).

29. Malíková P., Hajduková J., Nezvalová L.: Oxidace Polycyklických Aromatických Uhlovodíků Fentonovou Reakcí, *Geoscience Engineering*, **4**, 23-28 (2009).
30. Zufall C., Tyrell Th.: The Influence of Heavy Metal Ions on Beer Flavour Stabilit., *J. Inst. Brew.*, **114**, 134–142 (2008).
31. Piterková J., Tománková K., Luhová L., Petřivalský P., Peč P.: Oxidativní Stres: Lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku A jejich degradace v rostlinném organismu. *Chem. Listy*, **99**, 455 – 466 (2005).
32. Stražil Z., Hofbauer J., *Techologie pěstování a možnosti využití světlice barviřské – safloru*, Výzkumný ústav zemědělské techniky, Praha, 2007
33. http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Illustration_Carthamus_tinctorius0.jpg
34. <http://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id145702/>
35. <http://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id109515/?taxonid=41484>
36. Salem N., Msaada K., Hamdaoui G., Limam F., Marzouk B., Variation in Phenolic Composition and Antioxidant Activity during Flower Development of Safflower (*Carthamus tinctorius L.*). *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 4455–4463 (2011).
37. Fan L., Zhao H.-Y., Xu M., Zhou L., Guo H., Han J., Wang B.-R., Guo D.-A.: Qualitative evaluation and quantitative determination of 10 major active components in *Carthamus tinctorius L.* by high-performance liquid chromatography coupled with diode array detector. *Journal of Chromatography A*, **1216**, 2063–2070 (2009).
38. Tichá I., Tichý L., *Barvy z rostlin*. 1. vyd. Brno : Rezekvítek, 1997. 62 s.
39. Bidlová, V. *Barvení pomocí rostlin.*, 1. vyd. Praha : Grada, 2005. 86 s. ISBN 80-247-1022-6

40. Sun X., Wei X., Qu S., Zhao Y., Zhang X.: Hydroxysafflor Yellow A suppresses thrombin generation and inflammatory responses following focal cerebral ischemia-reperfusion in rats. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **20**, 4120–4124 (2010).
41. <http://www.zheng.cz/index.php?nid=2933&lid=CS&oid=2480985>
42. Shan L.-q., Ma S., Qiu X.-Ch, Zhou Y., Zhang Y., heng L.-h., Ren P.-ch., Wang Y.-C., Fan Q.-Y., Ma B.-a.: Hydroxysafflor Yellow A protects spinal cords from ischemia/reperfusion injury in rabbits. *BMCNeuroscience*, **11**, 98 (2010).
43. Sun X., Wei X., Qu S., Zhao Y., Zhang X.: Hydroxysafflor Yellow A suppresses thrombin generation and inflammatory responses following focal cerebral ischemia-reperfusion in rats. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **20**, 4120–4124 (2010).
44. Ji D.-B., Zhang L.Y., Li Ch. L., Ye J., Hai Bo Zhu H. B.: Effect of Hydroxysafflor yellow A on human umbilical vein endothelial cells under hypoxia. *Vascular Pharmacology*, **50**, 137–145 (2009).
45. Ji D.B., PhD, Zhu M. C., PhD,Zhu B., PhD, Zhu Y. Z., PhD, Li Ch. L., MD, Ye J., MD, PhD, Zhu H. B., PhD: Hydroxysafflor Yellow A Enhances Survival of Vascular Endothelial Cells Under Hypoxia via Upregulation of the HIF-1 α -VEGF Pathway and Regulation of Bcl-2/Bax. *J Cardiovasc Pharmacol*, **52**, 191–202(2008).
46. Wei X., Liu H., Sun X., Fu F., Zhang X., Wang J, An J., Ding H.: Hydroxysafflor yellow A protects rat brains against ischemia-reperfusion injury by antioxidant action. *Neuroscience Letters*, **386**, 58–62(2005).
47. H., Tian J.-W., Fu F.-H., Liu K., Li Ch.-L.: Therapeutic effects of hydroxysafflor yellow A on focal cerebral ischemic injury in rats and its primary mechanisms. *Journal of Asian Natural Products Research*, **7**, 607-613 (2005).

48. Zhu H., Wang Z., Ma Ch., Tian J., Fu F., Li Ch., Guo D., Roeder E., Liu K.: Neuroprotective Effect of Hydroxysafflor Yellow A: In Vivo and In Vitro Studies. *Planta Med*, **69**, 429-433 (2003).
49. Ye S.-Y., Gao W.-Y.: Hydroxysafflor Yellow A Protects Neuron Against Hypoxia Injury and Suppresses Inflammatory Responses Following Focal Ischemia Reperfusion in Rats. *Arch Pharm Res*, **31**, 1010-1015 (2008).
50. Wang T., Fu F., Han B., Zhang L.: Mechanism of hydroxysafflor yellow A on protecting ischemic myocardium. *Journal of molecular and cellular cardiology*, **40**, 957 (2006).
51. Liu Y.-N., Zhou Z.-M., Chen P.: Evidence that hydroxysafflor yellow a protects the heart against ischaemia–reperfusion injury by inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, **35**, 211-216 (2008).
52. Wang T., Fu F., Han B., Yu X., Zhu M., Zhang, L.: Effect of hydroxysafflor yellow a combined with nitroglycerin on acute myocardial infarction. *Journal of molecular and cellular cardiology* **42**, 216 (2007).
53. Tian W., Fu F.-H., Bing H., Li G.-S., Zhang L.-M., Liu K.: Hydroxysafflor yellow A reduces myocardial infarction size after coronary artery ligation in rats. *Pharmaceutical Biology*, **47**, 458-462 (2009).
54. Ningning D., Ming J., Wei W.: Inhibition effect of hydroxysafflor yellow A on rat cardiac myocyte apoptosis induced by myocardial ischemia. *Acta pharmacologica sinica*, **27**, 322 (2006).
55. Wu Y., Wang L., Jin M., Zang B.-X.: Hydroxysafflor Yellow A Alleviates Early Inflammatory Response of Bleomycin-Induced Mice Lung Injury. *Biol. Pharm. Bull.*, **35**, 515-522 (2012).

56. Wen A.-D., Yang J., Jia Y.-Y., Yang Z.-Y., Tian Y., Wua J., Wanga Z.-R., He Z.-Y.: A rapid and sensitive liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) method for the determination of hydroxysafflor yellow A in human plasma: Application to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*, **876**, 41–46 (2008).
57. Jin Y., Zhang X., Shi H., Xiao Y.-S., Y., Ke Y.-X., Xue X., Zhang X.-F.-F., Liang X.-M.: Characterization of C-glycosyl quinochalones in *Carthamus tinctorius* L. by ultraperformance liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **22**, 1275–1287 (2008).
58. Zhan Y., Xu J.-P., Liang J.-B., Sheng L.-S., Xiang B.-R., Zou Q.-G., Zhang Z.-J.: Simultaneous LC–MS–MS Analysis of Danshensu, Salvianolic Acid B, and Hydroxysafflor Yellow A in Beagle Dog Plasma, and Application of the Method to a Pharmacokinetic Study of Danhong Lyophilized Powder for Injection. *Chromatographia*, **68**, 71–79 (2008).

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

DNA	Deoxyribonukleová kyselina
Da	Dalton
LDL	low density lipoprotein
SCAFs	short-chain fatty acids
HSAY	Hydroxy saflor yellow A
Q-TOF	quadrupole – time of light
např.	například
atd.	a tak dále
apod.	a podobně
<i>in vivo</i>	výskyt organismů studovaný přímo v přirozených podmínkách
<i>in vitro</i>	výskyt organismů studovaný v uměle vyvolaných podmínkách
¹⁴ C	izotopicky značený uhlík
a kol.	a kolektivem
omega-3	skupina nenasycených mastných kyselin, jejichž společným rysem je dvojná vazba mezi uhlíky na třetím místě
HPLC	high-performance liquid chromatography
EI	electron ionozation
m/z	mass to charge ratio
MS	mass spektrometry
ppm	parts per milion
M _r	molární hmotnost (g/mol)
SPE	solid-phase-extraction

SEZNAM OBRÁZKŮ:

- Obr. 1: Základní struktura flavonoidů a systém, který se používá pro číslování uhlíkových atomů flavonoidového skeletu
- Obr. 2: Schéma redukce molekulárního kyslíku na vodu
- Obr. 3: Světlice barvířská
- Obr. 4: Květ světlice barvířské
- Obr. 5: Semena světlice barvířské
- Obr. 6: Struktura hydroxysafflor yellow A
- Obr. 7: Rekonstruovaný iontový chromatogram HSYA (m/z 611) standardu HSYA
- Obr. 8: MS spektrum zprůměrované z chromatografické separace standardu HSYA v retenčním čase 2,00-2,20 min
- Obr. 9: MS/MS spektrum iontu (m/z 611) v retenčním čase 2,00-2,20 min standardu HSYA
- Obr. 10: Mez detekce
- Obr. 11: Mez stanovitelnosti
- Obr. 12: Závislost korigované intenzity HSYA (m/z 611) na koncentraci
- Obr. 13: Rekonstruovaný iontový chromatogram HSYA (m/z 611) extraktu ze Sunárku
- Obr. 14: MS spektrum zprůměrované z chromatografické separace v retenčním čase 2,00-2,20 min extraktu ze Sunárku
- Obr. 15: MS/MS spektrum iontu (m/z 611) v retenčním čase 2,00-2,20 min extraktu ze Sunárku
- Obr. 16: Rekonstruovaný iontový chromatogram HSAY (m/z 611) bonbónů JOJO ABECEDA
- Obr. 17: MS spektrum zprůměrované z chromatografické separace v retenčním čase 2,00-2,20 min bonbónů JOJO ABECEDA
- Obr. 18: MS/MS spektrum iontu (m/z 611) v retenčním čase 2,00-2,20 min bonbónů JOJO ABECEDA
- Obr. 19: Rekonstruovaný iontový chromatogram HSYA (m/z 611) extraktu z květů světlice barvířské
- Obr. 20: MS spektrum zprůměrované z chromatografické separace v retenčním čase 2,00-2,20 min extraktu z květů světlice barvířské
- Obr. 21: MS/MS spektrum iontu (m/z 611) v retenčním čase 2,00-2,20 min extraktu z květů světlice barvířské

Obr. 22: Vznik fragmentu 491

Obr. 23: Vznik fragmentu 403

Obr. 24: Vznik fragmentu 325

Obr. 25: Vznik molekulárního iontu s m/z 325

Obr. 26: Fragmentace HSYA v pozitivním módu

SEZNAM TABULEK:

Tab. I: Hlavní třídy (poly)fenolických sloučenin

Tab. II: Rozdělení flavonoidů

Tab. III: Kvalitativní složení světlicového oleje

Tab. IV: Mobilní fáze s gradientovou elucí

Tab. V: Kalibrační křivka