

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chemie (FAPPZ)



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

Stanovení amygdalinu v semenech jádrového ovoce

Diplomová práce

Autor práce je Bc. Kseniia Fadeeva

FAPPZ

Kvalita potravin a zpracování zemědělských produktů

Vedoucí práce je Ing. Matyáš Orsák, Ph.D.

© 2023 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Stanovení amygdalinu v semenech jádrového ovoce" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 7.04.2023 _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala panu Ing. Matyáši Orsákovi, Ph.D. a paní Ing. Kláře Podhorecké za neocenitelnou pomoc při psaní textu diplomové práce a při provádění laboratorního výzkumu. Chtěla bych také poděkovat za Vaši trpělivost, optimismus a podporu.

Stanovení amygdalinu v semenech jádrového ovoce

Souhrn

Diplomová práce je věnována amygdalinu, zástupci kyanogenních glykosidů, rostlinám, ve kterých se vyskytuje a jejich použití. Glykosidy jsou látky rostlinného původu. Skládají se ze dvou složek, cukerné a necukerné části, tj. aglykonu.

Kyanogenní glykosidy jsou glykosidy aldehydů a ketonů, které jsou schopné uvolňovat za určitých podmínek kyanovodík (např. v trávicím traktu). Rostliny obsahující kyanogenní glykosidy jsou v přírodě zcela běžné. Nacházejí se ve flóře téměř ve všech částech světa. Známo je kolem 75 kyanogenních glykosidů. Jsou to kyanogeny mnoha rostlin konzumovaných jako složky lidské potravy nebo používaných jako krmiva hospodářských zvířat.

Amygdalin se skládá z disacharidu genciobinózy a aglykonu mandelonitrilu, který při enzymatické nebo kyselé hydrolyze uvolňuje obdobně jako další kyanogenní glykosidy toxickou složku kyanovodík (HCN), což může způsobit poškození nervového systému, neboť kyanovodík je toxický pro všechny živé buňky. K těmto procesům může dojít během vaření nebo též během dlouhodobého skladování kyanogenních potravin či krmiv. Uvolnění kyanovodíku může nastat též pokud tkáň rostliny obsahující amygdalin, je poškozena například napadením býložravci.

Amygdalin je nejběžnějším kyanogenním glykosidem v rostlinách z České republiky. Nachází se v rostlinách rodu slivoňovité (*Prunus*) z čeledi růžovité (*Rosaceae*). Nachází se v ovoci, které je tradičně konzumováno lidmi, a také toto ovoce slouží jako krmivo pro domácích zvířat. Významnými zdroji amygdalinu jsou hořké mandle a pecky meruněk, broskví, švestek a třešní.

Nejoblíbenějším ovocem v České republice jsou jablka. V malém množství je amygdalin obsažen také v jádrech jablek, hrušek a kdoulí. Jeho obsah v jablečných semenech se podle literárních údajů pohybuje od 1 do 4 mg.g⁻¹.

V peckách broskve je obsaženo 6,8 – 6,83 mg.g⁻¹ amygdalinu. Amygdalin byl nalezen též v jádrech švestky (0,44 – 17,75 mg.g⁻¹), meruňky (14,37 – 14,65 mg.g⁻¹) a třešní (2,68 – 4,2 mg.g⁻¹). V sušině jader hořkých mandlí byly stanovené hladiny amygdalinu 58,08 mg.g⁻¹ a v sušině jader sladkých mandlí 1,06 mg.g⁻¹, ale jsou známy také sladké odrůdy mandlí například *Texas*, v nichž amygdalin nebyl detekován.

Obsah amygdalinu v semenech ovocných stromů a v rostlinách je ovlivněn půdními a klimatickými podmínkami i dalšími vlivy. Bylo prokázáno, že obsah kyanogenních glykosidů roste v rostlinách s vysokou slaností půdy, v listech se syntetizují kyanogenní glykosidy a poté se transportují do jiných částí rostlin.

Na bázi amygdalinu se prodává též doplněk stravy Laetril, kterému jsou někdy přisuzovány protinádorové účinky. Na základě analýzy současných studií věnovaných tomuto tématu, však nelze dat jednoznačnou odpověď, zda amygdalin skutečně těmito vlastnostmi disponuje. Dokonce se amygdalinu dříve říkalo vitamin B₁₇, toto ale byla vědecky vyloučeno, že by se jednalo o látku s vitamínovými účinky.

Diplomová práce se zabývá obsahem amygdalinu v semenech jádrového ovoce, a semena jsou část zbytků po zpracování ovoce. Tato vedlejší produkty ovocnářství široce využívány v moderním potravinářském, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. Proto znalost všech složek těchto vedlejších produktů je velmi důležitá. Obsah amygdalinu v jablečných výlisků může ovlivnit růst mikroorganismů na jablečném substrátu nebo ovlivnit čistotu a bezpečnost doplňků výživy, které lze z jablečných výlisků získat. Však lze říci, že amygdalin neohrožuje vedlejší produkty ovocnářství zbývající po zpracování jablek a hrušek. Tento rostlinný materiál obsahuje relativně malé množství amygdalinu v důsledku jeho rozpadu při mechanickém a tepelném zpracování ovoce.

Byla provedena HPLC analýza semen 14 druhů jablek, 2 druhů hrušek a 1 druhu višně. Všechny vzorky byly analyzovány ve třech paralelních stanoveních. Většina odrůd jablek podle obsahu amygdalinu se nachází v rozmezí 1,08 – 1,31 mg.g⁻¹. Višně obsahovala 3,10 mg.g⁻¹ amygdalinu, hrušky od 0,06 do 0,07 mg.g⁻¹ amygdalinu.

Klíčová slova: glykosid; hrušky; jablka; kyselina kyanovodíková; protirakovinný účinek; sekundární metabolity; semena; vedlejší produkty

Determination of amygdalin in pome fruit seeds

Summary

The thesis is devoted to amygdalin, a representative of cyanogenic glycosides, the plants in which it occurs and their use. Glycosides are substances of plant origin. They consist of two components, a sugar and a non-sugar part, i.e. aglycone.

Cyanogenic glycosides are glycosides of aldehydes and ketones, which are able to release hydrogen cyanide under certain conditions (e.g. in the digestive tract). Plants containing cyanogenic glycosides are quite common in nature. They are found in the flora of almost all parts of the world. About 75 cyanogenic glycosides are known. They are the cyanogens of many plants consumed as components of human food or used as animal feed.

Amygdalin consists of genciobinose disaccharide and mandelonitrile aglycone, which during enzymatic or acid hydrolysis releases, similarly to other cyanogenic glycosides, the toxic component hydrogen cyanide (HCN), which can cause damage to the nervous system, as hydrogen cyanide is toxic to all living cells. These processes can occur during cooking or during long-term storage of cyanogenic food or feed. The release of hydrogen cyanide can also occur if plant tissue containing amygdalin is damaged, for example, by attack by herbivores.

Amygdalin is the most common cyanogenic glycoside in plants from the Czech Republic. It is found in plants of the plum family (*Prunus*) from the rose family (*Rosaceae*). It is found in fruits that are traditionally eaten by humans, and these fruits are also used as feed for domestic animals. Important sources of amygdalin are bitter almonds and pits of apricots, peaches, plums and cherries.

Apples are the most popular fruit in the Czech Republic. Small amounts of amygdalin are also found in the cores of apples, pears and quinces. According to literature data, its content in apple seeds ranges from 1 to 4 mg.g⁻¹.

Peach pits contain 6.8 – 6.83 mg.g⁻¹ of amygdalin. Amygdalin was also found in the kernels of plum (0.44 – 17.75 mg.g⁻¹), apricot (14.37 – 14.65 mg.g⁻¹) and cherry (2.68 – 4.2 mg.g⁻¹). Amygdalin levels of 58.08 mg.g⁻¹ and 1.06 mg.g⁻¹ in sweet almond kernel dry matter were determined, but sweet almond varieties such as *Texas* are also known in which amygdalin was not detected.

The content of amygdalin in the seeds of fruit trees and in plants is influenced by soil and climatic conditions as well as other influences. Cyanogenic glycosides have been shown to increase in plants with high soil salinity, cyanogenic glycosides are synthesized in the leaves and then transported to other plant parts.

The dietary supplement Laetrile is also sold based on amygdalin, which is sometimes attributed with anti-tumor effects. Based on the analysis of current studies devoted to this topic, however, it is not possible to give a definite answer as to whether amygdalin really possesses these properties. Even amygdalin used to be called vitamin B17, but this was scientifically ruled out as a substance with vitamin effects.

The diploma thesis deals with the content of amygdalin in pome fruit seeds, and the seeds are part of the residues after fruit processing. These by-products of fruit growing are widely used in the modern food, cosmetic and pharmaceutical industries. Therefore, knowing

all the ingredients of these by-products is very important. The content of amygdalin in apple pomace can affect the growth of microorganisms on the apple substrate or affect the purity and safety of nutritional supplements that can be obtained from apple pomace. However, it can be said that amygdalin does not threaten the by-products of the fruit industry remaining after the processing of apples and pears. This plant material contains a relatively small amount of amygdalin due to its breakdown during mechanical and thermal processing of the fruit.

HPLC analysis of the seeds of 14 types of apples, 2 types of pears and 1 type of sour cherry was performed. All samples were analyzed in three parallel determinations. Most apple varieties according to amygdalin content are in the range of 1.08 – 1.31 mg.g⁻¹. Sour cherries contained 3.10 mg.g⁻¹ amygdalin, pears from 0.06 to 0.07 mg.g⁻¹ amygdalin.

Keywords: anticancer effect; apples; by-products; glycoside; hydrocyanic acid; secondary metabolites; seeds; pears.

Obsah

1 Úvod	10
2 Vědecká hypotéza a cíle práce.....	11
3 Literární rešerše.....	12
3.1 Glykosidy jako sekundární metabolity rostlin	12
3.1.1 Sekundární metabolity, biologická aktivita a toxicita některých rostlinných látek.....	12
3.1.2 Charakteristika glykosidů	14
3.2 Kyanogenní glykosidy	16
3.2.1 Reakce a změny	17
3.2.2 Toxicita kyanogenních glykosidů	19
3.3 Amygdalin: vlastnosti a účinek na organismus teplokrevných živočichů, včetně lidí	20
3.3.1 Amygdalin a jeho možné protirakovinné vlastnosti	25
3.3.2 Vedlejší produkty ovocnářství.....	30
3.3.2.1 Použití semen jako vedlejších produktů ovocnářství.....	32
3.3.3 Složení jablečných semen	34
3.3.3.1 Složení hruškových semen.....	36
3.3.3.2 Amygdalin v jablkách a hruškách.....	37
3.3.3.3 Obsah amygdalinu v rostlinách a ve zpracovaných produktech	38
3.4 Metody stanovení amygdalinu.....	41
3.4.1 Metody extrakce amygdalinu	41
3.4.2 Metody stanovení amygdalinu metodou HPLC	43
4 Metodika	45
4.1 Použité chemikálie	45
4.2 Pomůcky	45
4.3 Přístroje.....	45
4.4 Experimentální material	46
4.4.1 Příprava vzorku.....	47
4.4.2 HPLC stanovení	48
5 Výsledky	49

6	Diskuze	51
7	Závěr	56
8	Literatura	57
9	Seznam obrázků.....	66
10	Seznam použitých zkratk a symbolů.....	67

Úvod

Použití biologicky aktivních látek ve formě přírodních rostlinných extraktů v potravinářském, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu je významné pro výzkum po celém světě. V tomto ohledu je potřeba hledat nejvhodnější rostliny s vysokým potenciálem pro syntézu těchto látek. Přírodní rostlinné výtažky mají absolutní výhodu oproti produktům syntetického původu. Farmakologický účinek přírodních rostlinných extraktů na lidské tělo se liší od syntetických extraktů univerzálním účinkem, užším rozsahem vedlejších účinků a slabými alergickými vlastnostmi. Produkce přírodních rostlinných výtažků vyžaduje zapojení nových druhů surovin.

Je však nutné si uvědomit, že ne všechny látky, které jsou syntetizovány v těle rostlin, lze považovat za prospěšné pro lidské zdraví. Rostliny používají mnoho sekundárních metabolitů k ochraně a odpuzování škůdců a jsou jedovaté. V jistém smyslu jsou všechny léky jedy. Je důležité vědět, jak a za jakým účelem je použít.

Od pradávna se plody rostlin Růžovité (*Rosaceae*) používají pro potravinářské a léčebné účely. Charakteristickým rysem rostlin této čeledi je přítomnost glykosidu amygdalinu.

Skutečnost, že látky získané ze semen některých rostlin čeledi růžovité (*Rosaceae*) jsou biologicky aktivní, je lidstvu již dlouho známá. Například ve starověkém Egyptě látka extrahovaná ze semen broskví byla použita jako jed. Dnes je známo, že se jednalo o amygdalin, z něhož se uvolňuje kyselina kyanovodíková, která vstupuje do lidského těla.

Čistý amygdalin poprvé byl izolován v 19. století. Ve druhé polovině 20. století americký biochemik E. Krebs ve snaze syntetizovat amygdalin syntetizoval látku, kterou nazval Laetрил. Laetрил je velmi podobný amygdalinu. Krebs tvrdil, že tato látka je vitamínem B₁₇ a má protirakovinový účinek. Od té doby ve vědeckém světě probíhá diskuze o amygdalinu a jeho vlastnostech. Po dobu více než půl století byla prováděna různá studia. Bylo zjištěno, že amygdalin se nachází v semenech více než 1000 rostlin, včetně semen jablek a hrušek. Plody těchto rostlin se běžně konzumují lidmi a používají se v potravinářském průmyslu.

Potravinářský průmysl vytváří velké množství vedlejších produktů, včetně těch ze zpracování ovocí, které mají obecně menší využití, a představují zátěž pro životní prostředí. Celosvětově však roste tendence ke zvýšenému využívání vedlejších produktů ovocnářství, zejména za účelem získávání dietních složek nebo bioaktivních sloučenin. Přibližně 30% celosvětové produkce jablek je určeno k výrobě džusů a moštů, přičemž primárním vedlejším produktem jsou výlisky. Čerstvé jablečné výlisky se obvykle kompostují, používají se jako přísada do krmiva pro zvířata a k výrobě bioplynu nebo se suší. Však větší úsilí bylo vynaloženo na využití tohoto vedlejšího produktu v potravinářském průmyslu.

Jablka jsou jedním z nejpobulárnějších plodů v České republice. Lze říci, že studium dostupných údajů o amygdalinu, obsaženém v semenech jablek a hrušek, je pro výzkum důležitým tématem. Díky rozvoji vědy a techniky se dnes člověk může lépe seznámit s tím, co může mít vliv na jeho zdraví a kvalitu života.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cíle byly následující:

- 1) Porovnat množství amygdalinu v různých odrůdách jablek a hrušek při pomoci HPLC.
- 2) Zjistit, zda je amygdalin ohrožením nebo potenciálním zdrojem zlepšení zdraví člověka, a je-li ohrožením nebo zdrojem obohacení vedlejších produktů při zpracování jablek a hrušek.

Hypotézy byly formulovány takto:

- 1) Amygdalin je biologicky aktivní látka, která má příznivý vliv na zdraví člověka.
- 2) Obsah amygdalinu v semenech jablek a hrušek je závislý na odrůdě, případně i na podmínkách pěstování.

3 Literární rešerše

3.1 Glykosidy jako sekundární metabolity rostlin

3.1.1 Sekundární metabolity, biologická aktivita a toxicita některých rostlinných látek.

Použití biologicky aktivních látek ve formě přírodních rostlinných extraktů v potravinářském, voňavkářském, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu je po celém světě velmi žádané. Z tohoto důvodu je třeba hledat nejvhodnější rostliny s vysokým potenciálem pro syntézu biologicky aktivních látek.

Přírodní rostlinné výtažky mají výhodu před produkty syntetického původu. Farmakologický účinek přírodních rostlinných extraktů na lidské tělo se liší od syntetických extraktů univerzálním účinkem, užším rozsahem vedlejších účinků a slabými alergenními vlastnostmi. Biologicky aktivní sloučeniny v rostlinách mají zpravidla nízkou molekulovou hmotnost a patří k sekundárním metabolitům.

Lze říci, že kromě primárních metabolitů – cukrů, aminokyselin, mastných kyselin, chlorofylů, cytochromů a nukleotidů existují sloučeniny, které jsou meziprodukty různých metabolických reakcí. Rostliny obsahují velké množství látek, které se nepodílejí na hlavním metabolismu. Nazývají se sekundární metabolity nebo látky sekundárního původu. Na rozdíl od primárních metabolitů přítomných ve všech rostlinných buňkách mohou být sekundární metabolity specifické pro jeden nebo více rostlinných druhů. Sekundární metabolity jsou organické molekuly, které se neúčastní růstu a vývoje organismu. Absence sekundárních metabolitů nevede k okamžité smrti, ale spíše k dlouhodobému zhoršení schopnosti organismu přežít. Tyto sloučeniny jsou velmi rozmanitou skupinou přírodních produktů syntetizovaných rostlinami, houbami, bakteriemi, řasami a živočichy. Různé třídy těchto sloučenin jsou často spojovány s úzkým souborem druhů v rámci fylogenetické skupiny a tvoří bioaktivní sloučeniny v několika léčivých a aromatických látkách, dále v barvivu a koření a/nebo ve funkčních látkách.

Sekundární rostlinné metabolity jsou sloučeniny, které nejsou nezbytné pro růst, vývoj nebo reprodukci rostliny. Hrají však důležitou roli v obraně rostliny proti býložravcům, patogenům a environmentálním stresům. Sekundární rostlinné metabolity mají různé chemické struktury a jsou syntetizovány různými biosyntetickými cestami. Jsou klasifikovány do různých skupin na základě jejich chemické struktury, jako jsou alkaloidy, flavonoidy, terpenoidy a fenolické sloučeniny. Tyto sloučeniny přitahují velkou pozornost kvůli jejich potenciálním zdravotním přínosům, včetně protizánětlivých, antioxidačních, antimikrobiálních a protirakovinných vlastností (Harborne & Williams, 2000).

Sekundární rostlinné metabolity jsou syntetizovány různými biosyntetickými cestami, včetně šikimátové dráhy, mevalonátové a nemevalonátové dráhy. Dráha šikimátu je zodpovědná za syntézu aromatických aminokyselin a fenolických sloučenin. V rostlinách poskytuje šikimátová dráha uhlíkové kostry pro aromatické aminokyseliny L-tryptofan, L-fenylalanin a L-tyrosin, které se mohou proměnit v řadu aromatických sekundárních metabolitů, jako jsou flavonoidy, alkaloidy a ligniny, a jsou mostem mezi metabolismem sacharidu a bílkovin. Využívá erythréza-4-fosfát a fosfoenolpyruvát, meziprodukty pentózofosfátové dráhy

a glykolýzové dráhy, k syntéze chorismátu za katalýzy šesti klíčových enzymů prostřednictvím sedmi kroků katalytické reakce (Yuan et al. 2022).

Mevalonátová dráha je jednou z hlavních drah podílejících se na biosyntéze sekundárních metabolitů v rostlinách, zejména při produkci terpenoidů. Cesta začíná kondenzací třech molekul acetyl-CoA, po které následuje řada enzymatických reakcí, které je přemění na mevalonát, klíčový prekurzor v biosyntéze terpenoidů (Rodríguez-Concepción & Boronat, 2002). Mevalonátová dráha byla rozsáhle studována u rostlin, jako jsou huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*) a lilek rajče (*Solanum lycopersicum*) a ukázalo se, že její regulace hraje důležitou roli v růstu a vývoji rostlin, stejně jako v reakci rostlin na environmentální stresy (Estévez et al. 2001).

Nemevalonátová dráha, známá také jako methylerythritolfosfátová dráha, je další hlavní biosyntetickou dráhou zapojenou do produkce isoprenoidních sloučenin v rostlinách, zejména při biosyntéze karotenoidů a fytolu, které jsou důležité pro fotosyntézu a vývoj rostlin (Enfissi et al. 2005). Methylerythritolfosfátová dráha začíná kondenzací pyruvátu a glycerinaldehyd-3-fosfátu za vzniku 1-deoxy-D-xylulóza-5-fosfátu, který je následně přeměněn na isopentenylpyrofosfát a dimethylallylpyrofosfát prostřednictvím série enzymatických reakcí.

Sekundární rostlinné metabolity hrají důležitou roli v obraně rostlin proti býložravcům, patogenům a environmentálním stresům. Například alkaloidy, jako kofein a nikotin jsou toxické pro hmyz, zatímco flavonoidy, jako antokyany a quercetin chrání rostliny před UV zářením. Fenolické sloučeniny, jako jsou taniny a lignin, poskytují mechanickou pevnost rostlinné buněčné stěně, zatímco terpenoidy, jako jsou silice, chrání rostlinu před býložravci a patogeny (Wink M. 2010).

Bylo zjištěno, že sekundární rostlinné metabolity mají potenciální zdravotní přínosy díky svým antioxidačním, protizánětlivým, antimikrobiálním a protirakovinným vlastnostem. Bylo například zjištěno, že flavonoidy, jako je kvercetin a katechiny, mají antioxidační vlastnosti, zatímco terpenoidy, jako je karvacrol a thymol, mají antimikrobiální vlastnosti. Bylo zjištěno, že fenolické sloučeniny, jako je resveratrol, mají protirakovinné vlastnosti, zatímco alkaloidy, jako je vinblastin a vinkristin, se používají při léčbě rakoviny (Cragg & Newman, 2013).

Sekundární metabolity jsou často produkovány na nejvyšší úrovni během přechodu z aktivního růstu do stacionární fáze. Producentický organismus může růst bez jejich syntézy, což naznačuje, že sekundární metabolismus není nezbytný, alespoň pro krátkodobé přežití. Z jiného hlediska je však nutné, aby geny zapojené do sekundárního metabolismu poskytovaly „genetické podmínky“, které umožňují mutaci a nabídku nových prospěšných vlastností prostřednictvím evoluce. Třetí pohled charakterizuje sekundární metabolismus jako nedílnou součást buněčného metabolismu a biologie; spoléhá na primární metabolismus, který dodává potřebné enzymy, energii, substráty a buněčné materiály a přispívá k dlouhodobému přežití producenta (Linz et al. 2011).

Nejpočetnější skupiny sekundárních metabolitů jsou: isoprenoidy, fenolické sloučeniny a alkaloidy. Každá z těchto skupin je rozdělena do mnoha podskupin. Kromě těchto hlavních skupin se dále rozlišují menší třídy sekundárních sloučenin rostlinného původu: kyanogenní glykosidy, glykosidy obsahující síru (thioglykosidy), rostlinné aminy, neproteinové aminokyseliny, polyacetyleny, betalainy, thiofeny atd. Někteří autoři také řadí mezi látky sekundárního metabolismu alifatické organické kyseliny a fytohormony.

Fytotoxiny jsou sekundární metabolity produkované rostlinami, které mají toxické účinky na jiné organismy, včetně zvířat, mikroorganismů, a dokonce i jiných rostlin. Tyto sloučeniny se vyvinuly jako součást obranného mechanismu rostliny proti býložravcům, patogenům a konkurentům. Fytotoxiny jsou strukturálně různorodé. Příklady fytotoxinů zahrnují kofein, nikotin a solanin, které jsou produkovány rostlinami kávy, tabáku a brambor. Bylo také prokázáno, že fytotoxiny mají léčivé vlastnosti a používají se v praxi tradiční medicíny. Mohou však mít také negativní dopady na zdraví lidí a zvířat, například způsobit otravu jídlem nebo alergie. Pochopení biosyntézy, regulace a ekologických funkcí fytotoxinů je důležité pro rozvoj udržitelných zemědělských postupů a objevování nových terapeutických sloučenin.

Klasifikace jedovatých rostlin je zásadní pro identifikaci a řízení toxicity rostlin u lidí i zvířat. Rostliny obsahující toxické sloučeniny lze kategorizovat na základě chemické struktury toxického činidla, postižených orgánů a klinických příznaků, které produkují. Například rostliny, které obsahují alkaloidy, jako je akonitin a atropin, jsou klasifikovány jako neurotoxické rostliny, zatímco rostliny, které obsahují srdeční glykosidy, jako je náprstník (*Digitalis*) a oleandr obecný (*Nerium oleander*), jsou klasifikovány jako kardiotoxické rostliny. Klasifikace jedovatých rostlin je nezbytná pro pochopení základních mechanismů toxicity, vývoj vhodných léčebných strategií a prevenci náhodné otravy.

Toxicita různých rostlin se může lišit v závislosti na poloze druhu v zeměpisné oblasti, povaze půdy a stanoviště, klimatických podmínkách v průběhu roku nebo stádiu vývoje.

Toxické vlastnosti stejných rostlin nemají stejný účinek na jednotlivé skupiny zvířat. Například rulík zlomocný (*Atropa Belladonna*) a durman (*Datura*), které jsou pro člověka vysoce toxické, jsou naprosto neškodné pro hlodavce a psy, ale způsobují otravu kachen a kuřat.

Otrava rostlinnými produkty je někdy také spojena s konzumací medu kontaminovaného jedovatým pylem z rostlin, nebo rovněž mléka a masa poté, co zvířata pozrou toxické rostliny (Neznamova 2007).

Biologicky aktivní látkou, na kterou je tato práce zaměřena je amygdalin. Amygdalin patří mezi organické sloučeniny, mandelický nitrilový gencybiosid, kyanogenní glykosid, který se nachází v jádrech semen mnoha rostlin čeledi růžovitých (*Rosaceae*) a dodává jim hořkou chuť. Poprvé byl izolován z hořké mandle *Prunus amygdalus var. Amara*. Jeho strukturu tvoří kosočtverečné krystaly s teplotou tání 215 ° C (Raquel et al. 2008).

3.1.2 Charakteristika glykosidů.

Amygdalin patří do skupiny glykosidů. Glykosidy jsou organické sloučeniny, zpravidla rostlinného původu, které se při hydrolýze štěpí na cukr a složku necukernou, zvanou aglykon. Molekula cukru může být glukóza, fruktóza, galaktóza nebo jiný monosacharid, řidčeji deoxycukry jako digitoxóza a cymaróza. Zatímco molekula necukru může být alkohol, fenol, steroid, terpenoid nebo jiné organické sloučeniny. Cukerná část je připojena k necukerné molekule prostřednictvím glykosidické vazby, která se vzniká mezi anomerním uhlíkem cukru a hydroxylovou skupinou aglykonu. Typ glykosidické vazby a poloha připojení se mohou lišit, což vede k rozmanitému rozsahu glykosidů.

Aglykon a cukr jsou propojeny vazbou podobnou esterické vazbě, proto je glykosidová molekula snadno rozrušena v přítomnosti vody za účasti enzymů obsažených v těchto

roślinách. Rozlišují se dvě skupiny – holosidy a heterosidy. Lze je dělit na oligosacharidy a polysacharidy (tzv. holosidy), protože je v nich glykosidická skupina substituována hydroxylovou skupinou dalšího monosacharidu. (Kysilka 2001).

Chemicky jsou glykosidy obvykle směsné acetal, ve kterých je hydroxylová skupina na anomerním atomu uhlíku nahrazena zbytkem obsahujícím nukleofilní atom. V případě O-glykosidů je nukleofilním atomem nejčastěji kyslík přítomný v alkoholu, fenolu nebo karboxylu. Cukrový hemiacetal může reagovat s hydroxylovou skupinou jiného cukru za vzniku disacharidu a reakce může být opakována za vzniku polysacharidů. Když je nukleofilním atomem síra, jako například v thiolové skupině, získají se S-glykosidy. N-glykosidy, jako jsou nukleosidy, se tvoří, když je nukleofilním atomem uhlík ve formě karbanionu, čímž vznikají C-glykosidy. V závislosti na stereokonfiguraci na anomerním atomu uhlíku jsou možné jak α -, tak β -glykosidy. Primárně se však vyskytují β formy v rostlinách. Většina přírodních enzymů hydrolyzuje pouze β -formy glykosidu (Mukherjee 2019).

Glykosidy lze klasifikovat na základě typu molekuly cukru, molekuly necukru a typu glykosidické vazby. Například flavonoidní glykosidy jsou klasifikovány na základě typu molekuly cukru (obvykle glukóza nebo rhamnóza) a typu flavonoidního aglykonu (např. quercetin, kaempferol). Srdeční glykosidy jsou klasifikovány na základě typu molekuly cukru (obvykle digitoxóza nebo digitonóza) a typu aglykonu (např. ouabain, digitoxín). Podobně lze klasifikovat terpenoidní glykosidy, fenolové glykosidy a iridoidní glykosidy na základě jejich chemické struktury.

Glykosidy jsou syntetizovány prostřednictvím aktivity glykosyltransferáz, které přenášejí cukernou část z aktivované donorové molekuly na aglykon. Aktivovaná donorová molekula je typicky nukleotidový cukr, jako je UDP-glukóza nebo UDP-galaktóza. Glykosyltransferázy jsou specifické pro typ cukru a aglykonu, což vede k tvorbě specifického glykosidu. Biosyntéza glykosidů je regulována různými faktory, jako je vývojová fáze, environmentální stres a genetické faktory (Harborne AJ. 1998). Při biosyntéze glykosidů je důležitý aldosa-1-fosfát jako dárce glykosylových jednotek.

V glykosidech bývá sacharidový řetězec často krátký a jen v několika málo sloučeninách, jako jsou steroidní alkaloidy a saponiny, je tento řetězec větvený. Žádné absolutní omezení však v této oblasti neexistuje. Podle počtu monosacharidů, které jsou v řetězci navázány na aglykon, se rozlišují monoglykosidy, diglykosidy a triglykosidy. Jsou-li tyto sacharidy navázány pouze v jedné poloze na aglykonu, hovoří se o tzv. monodesmosidech, jsou-li navázány na dvou místech, jedná se o bidesmosidy (například některé saponiny). Aglykony mohou být nejrozličnější látky. Musí však obsahovat skupinu schopnou glykosidové vazby. Tuto podmínku splňují alkoholy, fenoly, thioalkoholy, aminy a podobné látky (Kysilka 2001).

Všechny glykosidy se vyznačují nepřítomností tautomerních transformací v roztoku, tj. jejich přechod na acyklickou formu je nemožný, jelikož tento proces vyžaduje mobilní atom vodíku v poloacetalovém hydroxyly. Takováto forma hydroxyly se poté musí přeměnit na karbonylovou skupinu. Druhou společnou vlastností glykosidů je jejich poměrně snadná schopnost hydrolyzovat v kyselém prostředí, což je vlastně proces opačný k reakci jejich tvorby (Plemenkov 2001).

Glykosidy jsou jednou z nejčastěji se vyskytujících skupin přírodních sloučenin. Jedna rostlina obvykle obsahuje několik typů glykosidů. Například v listech náprstníku červeného

(*Digitalis purpurea*) se nachází až 70 různých glykosidů. V rostlinách jsou glykosidy obsaženy v různých rostlinných orgánech, a to v rozpuštěné formě v buněčné míze. Rostliny obsahující glykosidy přitahovaly pozornost od starověku. Už Egypťané a Římané používali urgiea přímořskou (*Drimia maritima*) ke stimulaci srdeční činnosti. Přípravky ze semen a kůry krutikvětu (*Strophantus hispidus*) byly použity nejen ke stimulaci srdeční aktivity, ale také k otravě šípů. Historie objevu glykosidů je spojena s náprstníkem červeným, který přešel od původní bylinné léčby (v té době jediný způsob léčby) k modernímu, nepostradatelnému léčivu. Poprvé jej začali používat léčitelé z Irsku a Anglie. Používal se jako projímadlo, prostředek pro vyvolání zvracení a vykašlávání hlenů (Karpuk 2011).

3.2 Kyanogenní glykosidy.

Kyanogeneze je schopnost rostlin a také některých jiných organismů produkovat rozkladem kyanogenních sloučenin kyanovodík. Kyanogenní sloučeniny neboli kyanogeny byly prokázány v různých částech zhruba 3000 druhů rostlin řazených do 110 čeledí. Předpokládá se, že v rostlinách svou hořkou chutí, pachem a toxicitou vzniklých rozkladných produktů odpuzují predátory a účastní se metabolismu dusíku, neboť jsou jeho zásobní formou při klíčení semen a v počátečních fázích vývoje rostlin. Kyanogeny se dělí na tři základní skupiny:

- kyanogenní glykosidy (β -glykosidy 2-hydroxynitrilů, β -glykosidy kyanhydrinů)
- pseudokyanogenní glykosidy (glykosidy methylazoxymethanolu neboli azoxyglykosidy)
- kyanogenní lipidy (kyanolipidy, estery kyanhydrinů s mastnými kyselinami).

Kromě těchto kyanogenů akumulují některé vyšší rostliny při asimilaci kyanovodíku, také různé nitrily. Mnoho rostlin dále produkuje kyanidy jako vedlejší produkty biosyntézy rostlinného hormonu ethenu (Velíšek 2009).

Kyanogenní glykosidy, kterých je známo asi 75, jsou nejdůležitějšími a nejrozšířenějšími kyanogeny mnoha rostlin konzumovaných jako složky lidské potravy nebo používaných jako krmiva hospodářských zvířat. Obecně se určitý kyanogenní glykosid vyskytuje jen v jedné či dvou čeledích rostlin a jeden či dva kyanogenní glykosidy se nacházejí v jedné rostlině (Velíšek 2009).

Až na některé výjimky je cukrem vázaným v kyanogenních glykosidech monosacharid β -D-glukóza. Kyanogenní glykosidy se člení podle aminokyselin, ze kterých vznikají biosyntézou. Nejčastěji jsou odvozeny od pěti hydrofobních AMK: valinu (linamarin), isoleucinu (lotaustralin), leucinu (heterodendrin a epiheterodendrin), phenylalaninu (amygdalin a prunasin) a tyrosinu (dhurrin, taxifyllin a triglochinin). Kyanogenní glykosidy se odvozují od L-aminokyselin. V rostlinných buňkách, které jsou schopné syntetizovat tyto glykosidy, existuje komplex obsahující enzymy, které přemění L-aminokyselinu v několika krocích na kyanhydrin, který je vzápětí glykosylován. Kyanovodík, který se uvolňuje při rozkladu kyanogenních glykosidů, je v rostlinách detoxikován reakcí s aminokyselinou L-cysteinem, přičemž vzniká sulfan a L-asparagin. Rostliny tedy mohou kyanovodík využít k syntetickým účelům (Kysilka 2001).

Řada kyanogenních glykosidů je odvozena od aromatických AMK fenylalaninu (epimerní pár β -glukosid (R)-prunasin a (S)-sambunigrin) a tyrosinu (β -glukosid (R)-taxifyllin a epimerní (S)-dhurrin). Prunasin je kyanogenním β -glukosidem semen mnoha rostlin čeledi růžovitých (*Rosaceae*), slivoní (*Prunus spp.*), meruňk (*Armeniaca spp.*), broskvoní (*Persica spp.*), jabloní (*Malus spp.*), hrušní (*Pirus spp.*), kdouloní (*Cydonia spp.*), jeřábu (*Sorbus spp.*), skalníků (*Cotonoaster spp.*) a také mnoha akácií (*Acacia spp.*, bobovité, *Fabaceae*), přítomen je také v plodech mučenky (*Passiflora spp.*) (Velíšek 2009).

Stejný aglykon jako prunasin (nitril D-mandlové kyseliny) obsahuje amygdalin. V podmínkách ČR je amygdalin nejvýznamnějším kyanogenním glykosidem. Amygdalin je přítomný v rostlinách čeledi růžovitých (*Rosaceae*). Významnými zdroji jsou hořké mandle a pecky meruňk, broskví, švestek a třešní. V malém množství je také obsažen v jádrech jablek, hrušek a kdoulí. Množství amygdalinu není velké a není ani životu nebezpečné. K otravám dochází většinou jen náhodně, například při konzumaci většího množství pecek hořkých mandlí dětmi (Velíšek 2009).

Pseudokyanogenní glykosidy (azoxyglykosidy) se vyskytují v rostlinách čeledi cykasovitých (*Cycadaceae*). Pseudokyanogenní glykosid cikasin se vyskytuje v semenech cykasů. Tento druh sago se využívá jako zdroj škrobu. Cikasin má karcinogenní a mutagenní vlastnosti. Karcinogenní vlastnosti cikasinu se projevují při jeho rozkladu v těle působením beta-glukosidázy střevní flóry za vzniku aglykonu methylazoxymetanolu. Příjem cikasinu s pitnou vodou v dávce $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ po dobu 10 dnů vedlo k vývoji nádorů jater potkanů ve více než 80 % případů. Nádory ledvin, střev, jater, plic a mozku mohou být vyvolány jedinou subkutánní injekcí cikasinu u novorozenech potkanů. U myši způsobuje cikasin hematomy, nádory ledvin, leukémii, plicní adenomy a u syrských křečků, morčat a akvarijních ryb nádory jater. Cikazin má také teratogenní vlastnosti (Petrovsky 1988). Výskyt neurologické poruchy připomínající Parkinsonovu chorobu byl zaznamenán v různých oblastech Pacifiku. Neurologicky poruchy mohou být také způsobeny přítomností lathyrogeneru 2,4-diaminomáslé kyseliny (Velíšek 2009).

Kyanogenní lipidy byly prokázány v semenech některých rostlin čeledi mýdelníkovitých (*Sapindaceae*), které se však pro lidskou výživu nepoužívají. Všechny kyanolipidy mají pětiuhlíkatý skelet odvozený od leucinu a kyanoskupinu s jednou nebo dvěma hydroxyskupinami esterifikovanými mastnými kyselinami. Během hydrolyzy tvoří kyanolipidy volnou kyselinu kyanovodíkovou.

3.2.1 Reakce a změny.

Glukosinoláty jsou v rostlinném pletivu doprovázeny enzymem myrosinázou (thioglukosidglukohydrolázou), která katalyzuje jejich rozklad. Myrosináza je globulární glykoprotein skládající se z několika isoenzymů. Zvláštností je výskyt myrosinázy v některých mikroorganismech, v houbách, a dokonce i v tkáních některých živočichů. V neporušeném pletivu je myrosináza umístěna od glukosinolitů odděleně, ovšem při mechanickém porušení buněk rostlinného pletiva (např. krájení, kousání, pomrznutí či napadení škůdci) dochází k poměrně rychlé enzymové hydrolyze. Například v neporušených buňkách jetele plazivého je linamarin obsažen ve vakuolách, zatímco enzymy v buněčné stěně. Ke kontaktu substrátu s enzymy dochází po posečení rostlin, při drcení semen, žvýkání, působením ledových krystalků

při pomrznutí, ale také při mimořádném suchu či napadení škůdci (Velíšek 2009). Rychlost hydrolýzy je dána aktivitou enzymu, kterou ovlivňuje řada faktorů (teplota a hodnota pH prostředí, druh a část rostliny či přítomnost látek působících jako aktivátory či inhibitory).

Průběh reakce je ovlivňován teplem. Během tepelného zpracování zelenin dojde k inaktivaci enzymových systémů, včetně myrosinázy a epithiospecifického proteinu. V závislosti na teplotě a délce trvání tepelné úpravy jsou částečně rozkládány jak glukosinoláty (ke ztrátám dochází z velké části i výluhem), tak některé vznikající termolabilní produkty (např. askorbigen). Kromě toho dochází k těkání řady látek, především nízkomolekulárních isothiokyanátů, čímž se výrazně změní aroma takto zpracované zeleniny. Porušení rostlinného pletiva, jemuž předcházela dostatečně účinný tepelný zásah, již nemá za následek enzymový rozklad glukosinolátů a část dosud přítomných nerozložených glukosinolátů je pak potravou přijímána. Při blanšírování a vaření zelenin se značná část glukosinolátů vyluhuje, v průměru 30 – 40 %. Ve zmrazených zeleninách se v důsledku aktivity myrosinázy v poškozených pletivech nachází asi 50 % původně přítomných glukosinolátů. Při kvašení zelí dojde během prvního týdne fermentace k prakticky úplnému rozkladu glukosinolátů (Velíšek 2009).

Často jedna látka, která vzniká rozkladem glukosinolátu, vykazuje hned několik biologických účinků. Rozkladem alifatických glukosinolátů vznikají slabě strumigenní isothiokyanáty, z nichž některé vykazují antimikrobní a insekticidní účinky (například allylisothiokyanát vzniklý ze sinigrinu). Dalšími produkty jsou nitrily a kyanoeptioalkany, jež působí hepatotoxicky a nefrotoxicky. Silně strumigenní goitrin vznikající hydrolýzou progoitrinu inhibuje syntézu thyroïdních hormonů (thyroxin, trijodthyronin) a přenos jodu ve štítné žláze. Thiokyanátový anion, vznikající z nestabilních aromatických a indolových isothiokyanátů, vykazuje středně silnou strumigenní aktivitu, ovšem na rozdíl od goitrinu a isothiokyanátů působí kompetitivně ve vztahu k jodu. Oba mechanismy mohou vést ke zvětšení štítné žlázy (struma) a posléze i k poruchám její funkce (Velíšek 2009).

Kyanogenní glykosidy jsou zpravidla přítomny v buněčných vakuolách a β -glykosidáza, která štěpí cukerný fragment molekuly je uložena v cytosolu. Je třeba poznamenat, že pro β -glykosidázy je charakteristická selektivita vůči různým kyanogenním glykosidům. Zejména glykosidázy, které jsou aktivní při odbourávání aromatických kyanogenních glykosidů, jsou mnohem méně aktivní proti glykosidům s alifatickými aglykony (linamarin, lotaustralin).

Při enzymovém rozkladu amygdalinu vzniká v rostlinách z kyanovodíku jako produkt detoxikace L-3-kyanoalanin, který přechází na asparagin.

Zředěnými kyselinami za zvýšené teploty se kyanogenní glykosidy hydrolyzují na cukry a nitrily 2-hydroxykyselin. Z amygdalinu vzniká nitril D-mandlové kyseliny. V koncentrovaných kyselinách vznikají hydrolýzou nitrilů 2-hydroxykyseliny a amonné soli. Z amygdalinu takto vzniká D-mandlová kyselina (Velíšek 2009).

V slabě alkalickém prostředí dochází k epimeraci kyanogenních glykosidů. Z amygdalinu vzniká směs, která se nazývá isoamygdalin. Příslušný epimer amygdalinu odvozený od L-mandlové kyseliny, který se nazývá (S)-neoamygdalin, se v přírodě nevyskytuje. Produktem hydrolýzy amygdalinu v alkalickém prostředí je například epimerní směs genciobiosidu kyseliny mandlové, která se nazývá amygdalinová kyselina.

Kyanovodík uvolňovaný z kyanogenů je jedním z prekurzorů toxického ethylkarbamátu, který se vyskytuje hlavně v destilátech z peckového ovoce (Velíšek 2009).

Reakci kyanogenních glykosidů mohou ovlivnit vnější faktory. Teplota a pH ovlivňují reakce, které poskytují karbonylové složky a kyanovodík. Při alkalickém pH a teplotách vyšších než 60 °C je kyanogeneze rychlejší. Chirální kyanohydrinový uhlík v kyanogenních glykosidech může být epimerizován zředěnou bází (Coats et al. 2002). Hodnota pH má vliv jak na rychlost enzymové hydrolýzy (myrosinázy různých rostlin mají obvykle několik optim pH ležících v intervalu 5 – 8, což je dáno přítomností několika isoenzymů), tak na mechanismus degradace nestabilního aglykonu. Obecně vznikají v kyselém prostředí (pH < 4) převážně nitrily, zatímco při vyšším pH vzniká více isothiokyanátů (Velíšek 2009).

Pseudokyanogenní glykosidy se rozkládají jiným způsobem než kyanogenní glykosidy. V slabě alkalickém prostředí uvolňují kyanidy, mravenčany a elementární dusík, v kyselém prostředí formaldehyd, methanol a elementární dusík. Enzymovým rozkladem vzniká methylazoxymethanol (Velíšek 2009).

3.2.2 Toxicita kyanogenních glykosidů.

Množství kyseliny kyanovodíkové produkované v kyanogenních rostlinách za vhodných podmínek se značně liší. Chemické studie volně rostoucích a kultivovaných kyanogenních rostlin na obsah kyseliny kyanovodíkové odhalují určitou závislost procesů kyanogeneze na věku rostlin a povaze místních ekologických podmínek, zejména půdy.

Štěpení probíhá v pletivech nějakým způsobem mechanicky poškozených, kdy se glykosidy a enzymy, dosud uložené odděleně, dostanou do vzájemného styku.

Toxicita kyanogenních glykosidů a jejich derivátů závisí na uvolňování kyanovodíku a může vést k akutní otravě kyanidem. Byla také zapojena do etiologie několika chronických onemocnění. Zvýšená hladina kyanogenních glykosidů v dietě může z dlouhodobého hlediska způsobit akutní otravu kyanidem nebo oslabit nevratný neurologický stav (Bolarinwa et al. 2016).

Toxicita kyanogenních glykosidů se může lišit v důsledku následujících faktorů.

1. Koncentrace kyanogenních glykosidů v rostlině může mít podprahovou toxicitu.
2. Specializovaný hmyz může být vyvinut tak, aby toleroval vyšší HCN ve stravě.
3. Všeobecný hmyz může konzumovat kyanogenní rostlinu jako součást smíšené stravy, takže toxicita může být zředěna pod prahovou hodnotu.
4. Způsob požívání rostliny může minimalizovat poškození tkání v listech (například mšice, které vyživují floém), aby se omezila expozice kyanogenních glykosidů degradačním β -glukosidázám.

Cesta rozkladu kyanogenních glykosidů může vést k akumulaci v rostlině kyanohydrinů, keto sloučenin, HCN, β -kyanoalaninu, thiokyanátu a siřičitanu. Všechny tyto sloučeniny mají obranné vlastnosti.

- Kyanogenní glykosidy působí díky své hořké chuti jako odstrašující prostředek.
- Aldehydy a ketony mají cytotoxickou aktivitu.
- HCN je inhibitor dýchání.
- β -kyanoalanin je neurotoxin.
- Thiokyanát a siřičitan jsou inhibitory enzymů.

- Primární odstrašující účinek kyanogenních glykosidů je způsoben jejich ketosloučeninou (Naveena et al. 2021).

Podstata působení kyanovodíku na teplokrevné živočichy spočívá v tom, že způsobuje rychlé udušení v důsledku blokování dýchacích enzymů a poruch funkcí tkání dýchacích cest. Všechny kyanidové sloučeniny schopné odštěpovat HCN a jsou schopny tvořit CN⁻ ionty. Pokud se kyanid dostane do těla, rychle se vstřebává a cirkuluje, poté se sloučí s methemoglobinem a vytvoří kyanomethemoglobin. Cirkulující kyanid inaktivuje cytochrom oxidázový enzym vázáním trojmocného železa (Fe³⁺), které je uvnitř tohoto enzymu. Enzym cytochrom oxidáza obvykle katalyzuje poslední krok oxidační fosforylace. Komplex enzym – kyanid brání provedení tohoto kroku. Z tohoto důvodu se enzym nemůže kombinovat s kyslíkem a transport elektronů je inhibován. Pacient nemá dostatek kyslíku a zastavení dýchání buněk nastává okamžitě. V důsledku tohoto procesu dochází k úmrtí v důsledku histotoxické anoxie (Yildiz et al. 2017).

Při akutní otravě HCN jsou postiženy nejprve respirační a vazomotorická centra (nejprve dochází k prohloubení dechu a zvýšení krevního tlaku, poté nastává paralýza dýchání a prudký pokles krevního tlaku). Kyanidy inhibují oxidativní fosforylaci energetických procesů v nervových buňkách a také inhibují enzymy, které katalyzují biotransformaci řady AMK (histidin, tryptofan, tyrosin). Výrazné snížení schopnosti tkání spotřebovávat kyslík je indikováno šarlatovou barvou krve v žilách. V prvním okamžiku otravy je rozhodující kyslíkové hladovění tkání, následně se mohou objevit degenerativní změny v centrálním nervovém systému. V případě chronického vystavení HCN hraje důležitou roli inhibice produkce hormonu štítné žlázy, která není způsobena HCN ale vznikajícími thiokyanáty. Citlivost organismu na akutní působení kyanidů je spojena s úrovní spotřeby kyslíku. Na nízké úrovni (např. během hibernace) prudce roste rezistence k intoxikaci, což je obecně spojeno se snížením tělesné teploty a zvýšením rezistence vůči hypoxii.

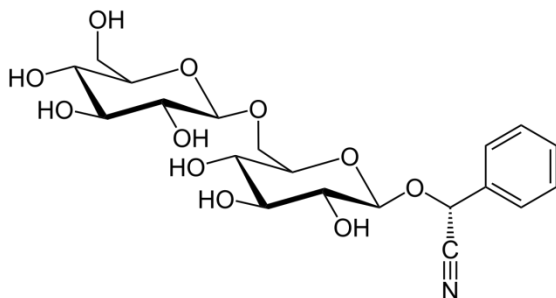
Hlavní opatření pro záchranu života v případě otravy kyanidem jsou: (1) okamžitá léčba podáním 100% kyslíku, (2) ochrana dýchacích cest a (3) kardiopulmonální resuscitace. Léčba zahrnuje endotracheální intubaci u pacientů s komou. Také je možné použít podávání antiepileptických léků v případě záchvatů, kontinuálního epinefrinu ve fázi pro korekci kardiiovaskulárního kolapsu a bikarbonátu sodného a neboť se předpokládá, že tato podpůrná léčba je účinná při otravě čistým kyanidem (Megarbane et al. 2013).

3.3 Amygdalin: vlastnosti a účinek na organismus teplokrevných živočichů, včetně lidí

Kyanogenní glykosidy, včetně amygdalinu, jsou přirozeně se vyskytující rostlinné toxiny. Amygdalin má rostlinný původ a je přítomen v semenech jader přibližně 800 rostlin. Primárně se amygdalin vyskytuje v rostlinách čeledi *Rosaceae*. Zástupci čeledi se vyskytují po celém světě, největší druhové bohatství je v severním mírném pásu. Je logické, že se tyto rostliny mohou objevit v krmivech zvířat a jsou zároveň konzumovány lidmi. Semena rodu *Prunus* jsou jedním z nejbohatších zdrojů amygdalinu, jedná se o semena hořkých mandlí, meruněk, třešní, broskví, švestek, nektarinek a jablek. Amygdalin obsahují také semena oliv,

hroznů a pohanky. Kromě amygdalinu jsou tato semena bohatá na bílkoviny, polynenasycené tuky a další živiny a obsahují až 2 procenta nebo více nitrilozidu (Salama et al. 2019).

Amygdalin patří do skupiny aromatických kyanogenních glykosidů. Aktivní formou amygdalinu je pravostranná struktura R-amygdalin, což je jeho přirozená forma.



Obrázek 1. Amygdalin

Kyanogenní glykosidy jsou uloženy ve vakuolách uvnitř rostlinných buněk. Při narušení tkání, například drcením, přicházejí kyanogenní glykosidy do styku s endogenními enzymy, což má za následek uvolnění kyanovodíku. V rostlinách proto kyanogenní glykosidy slouží jako důležité chemické obranné sloučeniny proti býložravcům.

Amygdalin je bílá krystalická látka s molekulovou hmotností $457,429 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Při zahřívání tvoří krystaly lehce hořké chuti, snadno rozpustné ve vodě a alkoholu, těžko rozpustné za chladu. Není rozpustný v diethyletheru. Bezvodý amygdalin taje při $215 \text{ }^\circ\text{C}$ a otáčí rovinu polarizovaného světla doleva: $[\alpha]_{\text{D}} - 40 \text{ }^\circ$.

Amygdalin poprvé izoloval v roce 1803 P.J. Robiquet a A. F. Boutron-Charlard. V roce 1830 byl zkoumán Justem von Liebig a Friedrichem. V roce 1950 vyvinul americký biochemik E. T. Krebs metodu syntézy látky velmi podobnou amygdalinu a dal jí název Vitamin B₁₇. Existuje také název Laertil.

Laertil označil spíše za vitamin nebo jako doplněk výživy než za lék. Ve skutečnosti se však omylem někdy označuje jako vitamin B₁₇, přestože sloučenina není vitaminem (Salama et al. 2019).

Amygdalin (D-mandelonitril-β-D-gentiobiosid) se skládá z cukerné složky, tj. ze dvou molekul glukózy a aglykonu, tedy jedné molekuly benzaldehydu, který vyvolává analgetický účinek a z jedné molekuly kyseliny kyanovodíkové, která je jedovatá.

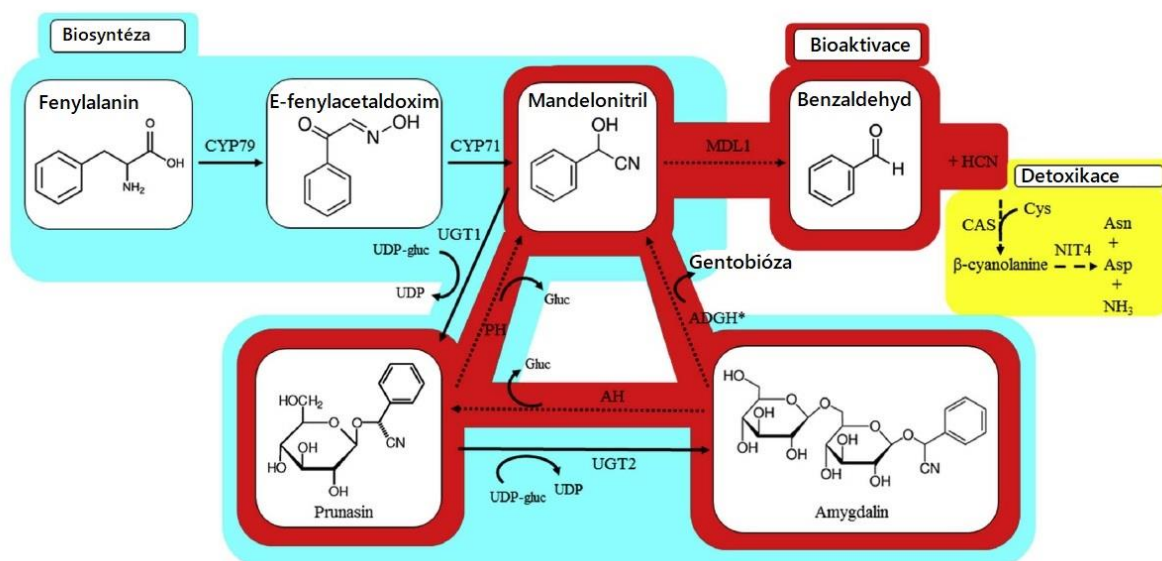
Benzaldehyd je nejjednodušší aromatický aldehyd s molekulovou hmotností $106,12 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, je to bezbarvá kapalina s charakteristickou vůní hořkých mandlí nebo semen jablek, při skladování žloutne a se oxidována atmosférickým kyslíkem na benzoylperoxid, který je výbušný. Později přechází na benzoovou kyselinu. Zřetelný zápach látky je cítit při koncentraci $3 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$. V množství $100 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ způsobuje jediné vdechnutí podráždění nosní sliznice, desetinásobná expozice $0,15 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ způsobuje podráždění očí a horních cest dýchacích. Smrtelná dávka pro člověka je 50 – 60 g.

Kyanidy představují skupinu látek, pro kterou je charakteristický výskyt chemické skupiny sestávající z uhlíku a dusíku, které jsou spojeny trojnou vazbou ($\text{C}\equiv\text{N}$). Anorganické kyanidy obsahují vysoce toxický kyanidový ion CN^- , odvozený od kyseliny kyanovodíkové (HCN). Existují také kyanidy na organické bázi, kde se skupina $\text{C}\equiv\text{N}$ váže na další atom uhlíku jednoduchou vazbou (Buchancová et al. 2003).

Kyselina kyanovodíková je plyn nebo bezbarvá kapalina (bod varu je 25,6 °C, bod tání je 13,3 °C, hustota je 0,699 g.cm⁻³) se snadno mísí s vodou a s řadou organických rozpouštědel. Při teplotě -13,3 °C kyselina kyanovodíková ztvrdne a vytvoří vláknitou krystalickou hmotu. Kyselina kyanovodíková je slabá kyselina. Ve volném stavu se kyselina kyanovodíková v přírodě nevyskytuje, avšak vyskytuje se ve formě chemických sloučenin, které zahrnují glykosidy. Kyanovodík je systémová chemická dusivá látka. Naruší normální využití kyslíku téměř každým orgánem těla. Expozice kyanovodíku může být rychle fatální. Má celotělové (systémové) účinky, zejména ovlivňuje ty orgánové systémy, které jsou nejcitlivější na nízkou hladinu kyslíku, tj. centrální nervový systém (mozek), kardiovaskulární systém (srdce a krevní cévy) a plicní systém (plíce). Používá se komerčně pro fumigaci, galvanizaci, těžbu zlata, chemickou syntézu a výrobu syntetických vláken, plastů, barviv a pesticidů. Plynný kyanovodík má výrazný hořký mandlový zápach (jiní popisují zatuchlou „vůni starých tenisek“), ale velká část lidí není schopna ho detekovat. Zápach neposkytuje dostatečné varování před nebezpečnými koncentracemi. Má také hořkou pálivou chuť a často se používá jako roztok ve vodě (Hydrogen cyanide, CID = 768).

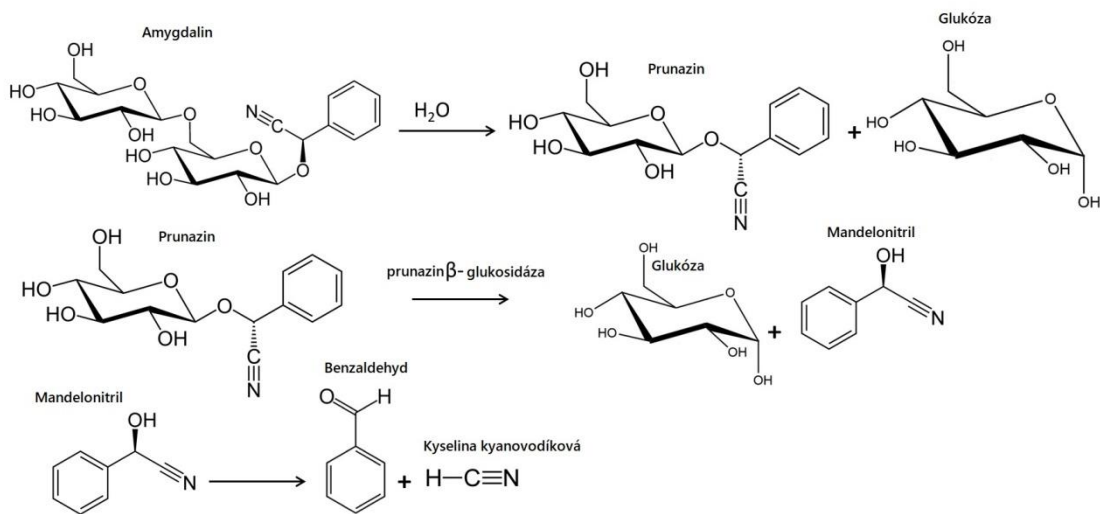
Cukerná složka se jmenuje genciobióza (také amygdalóza). Je to organická sloučenina, disacharid, který se skládá ze dvou zbytků D-glukózy spojených prostřednictvím β (1 → 6)-glykosidových vazeb. Nachází se pouze ve sloučeninách v přírodě. Aglykon se naváže na cukernou složku prostřednictvím jedné molekuly kyslíku, proto amygdalin patří mezi O-glykosidy. V rostlinách se v této vázané formě ve formě glykosidů velmi často vyskytují přírodní sloučeniny s hydroxylovými skupinami (Plemenkov 2001). Aglykony nebo α -kvanhydriny, jejichž vlastností je schopnost vylučovat kyselinu kyanovodíkovou enzymatickou hydrolýzou kvanogenních glykosidů, jsou tvořeny z odpovídajících aminokyselin. Nitrilová skupina je vytvořena z aminoskupiny, karboxylová skupina zůstává ve formě -COOH. D-glukóza se téměř vždy objevuje jako zbytek cukru, jehož glykosidická vazba má β -konfiguraci.

Biosyntéza amygdalinu začíná aminokyselinou L-fenylalaninem (Phe), který je N-hydroxylován a převeden na prunasin dvěma cytochromy P450 (CYP79 a CYP71) a UDP-glukosyltransferázou (UGT1) (Franks et al. 2008). V konečné fázi je prunasin přeměněn na amygdalin prostřednictvím další neznámé UDP-glukosyltransferázy (UGT2). Proces biosyntézy amygdalinu je uveden na obrázku 10 (Sánchez-Pérez et al. 2018).



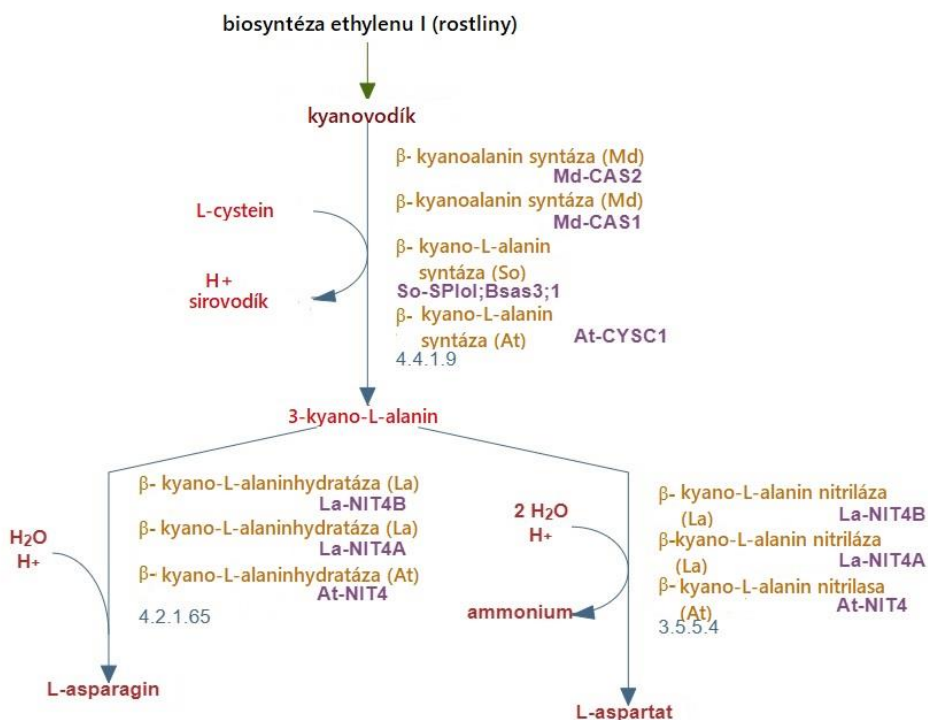
Obrázek 2. Biosyntéza amygdalinu

K bioaktivaci amygdalinu dochází pomocí enzymů. Amygdalin může být hydrolyzován amygdalin-hydrolázou za vzniku prunasinu a glukózy. Prunasin je následně hydrolyzován prunasin-hydrolázou, uvolňující mandelonitril a glukózu. Oba enzymy jsou β -glukosidázy, které patří do skupiny 1 glykosidových hydroláz (Del Cueto et al. 2018). Hydrolázy jsou skupinou enzymů, které katalyzují hydrolýzu kovalentních vazeb, kde činitelem rozkladu může být voda. β -glukosidázy katalyzují hydrolýzu β -glykosidických vazeb mezi cukernými složkami nebo mezi cukrem a aglykonem. Kyanogenní glukosidy a β -glukosidázy jsou lokalizovány v různých částech buňky. Pouze v případě, že je tkáň poškozena například napadením býložravci, jsou kyanogenní glukosidy bioaktivovány β -glukosidázami, přičemž se mimo jiné uvolňuje kyanovodík, jenž poskytuje okamžitou chemickou obranu proti býložravcům (Del Cueto et al. 2018). V posledním kroku mandelonitril-lyáza hydrolyzuje mandelonitril za vzniku benzaldehydu, který dává hořkou chuť a uvolňuje kyanovodík, který je toxický. Tento proces se nazývá kyanogeneze a mohou se ho účastnit jak některé rostliny, tak i zástupci živočišné říše například hmyz. Proces kyanogeneze je uveden na obrázku 3.



Obrázek 3. Kyanogeneze

Kyanid je toxický pro všechny živé buňky a vyžaduje rychlou detoxikaci v rostlinných tkáních. Kyanid je detoxikován na 3-kyano-L-alanin, neproteinovou aminokyselinu, která je široce rozšířena ve vyšších rostlinách a je pro mnoho zvířat neurotoxická. Ve většině rostlin lze 3-kyano-L-alanin dále metabolizovat na L-asparagin a L-aspartát (Piotrowski et al. 2001). Tento metabolický proces je zobrazen na obrázku 4.



Obrázek 4. Proces detoxikaci amygdalinu v rostlinných tkáních

Činnost kyanid-detoxikační cesty je založena na nitrilázách a vede k současné produkci zdroje dusíku pro rostlinu. Tato cesta sestává z následujících dvou kroků: β -kyanoalanin syntáza katalyzuje reakci mezi HCN a L-cysteinem za účelem syntézy β -kyanoalaninu, vzniku amoniaku, L-asparagové kyseliny a L-asparaginu z H_2O a β -kyanoalaninu (Del Cueto et al. 2018).

Pokud amygdalin není pro rostliny jedovatou látkou, a naopak pomáhá rostlinám prostřednictvím obranných mechanismů, nabízí se otázka, jak tato látka ovlivňuje teplokrevné živočichy. Nejviditelnějším účinkem na teplokrevné živočichy je možnost otravy kyanidem. Určitým nebezpečím je možnost otravy produktem hydrolýzy amygdalinu u domácích zvířat krmených rostlinami, které obsahují kyanogenní glykosidy. Otrava kyanidem u hospodářských zvířat může mít za následek náhlou smrt, zatímco subletální expozice může způsobit neurologické příznaky a sníženou výkonnost. Otrava kyanidem ve volné přírodě může způsobit pokles populace a ekologické narušení.

Otrava amygdalinem též kyanidem u lidí může nastat při úmyslné nebo náhodné expozici. Sebevražedné pokusy s použitím kyanidu mohou způsobit rychlý nástup příznaků otravy a smrt. K náhodné expozici může dojít na pracovišti, například při průmyslových haváriích, nebo při požití kontaminovaných potravin nebo vody. Otrava kyanidem u lidí může způsobit řadu příznaků, od mírných až po těžké, a může mít za následek dlouhodobé neurologické poškození nebo chronické zdravotní účinky.

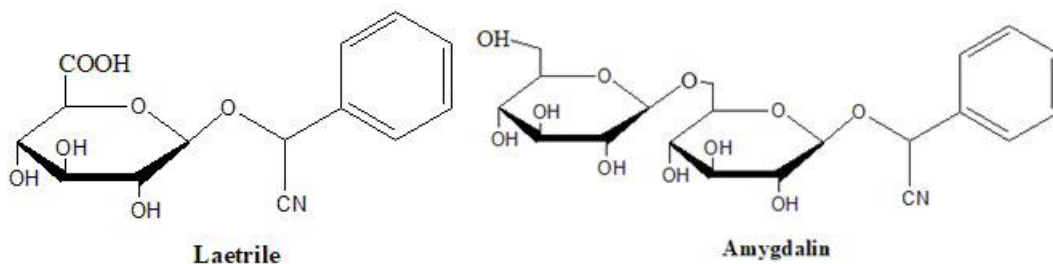
3.3.1 Amygdalin a jeho možné protirakovinné vlastnosti

Rakovina je skupina onemocnění charakterizovaných nekontrolovaným růstem a metastázováním maligních buněk v celém těle. V průběhu 20. a 21. století byla rakovina jednou z nejdůležitějších příčin úmrtí. Bylo zavedeno mnoho možností léčby rakoviny, jako je ozařování, chemoterapie a chirurgie. Bylinná medicína je však považována za možnou budoucí léčbu rakoviny kvůli jejím nízkým vedlejším účinkům, vysoké farmakologické účinnosti a možnosti získat ji za nízké ceny. Přírodní produkty jsou slibným zdrojem pro vývoj chemopreventivních a chemoterapeutických léků. Přibližně 80 % všech léků schválených FDA v posledních třech desetiletích pocházelo z přírodních zdrojů (El-Ela et al. 2022). Meruňkový jadra obsahující amygdalin byly použity jako modelový bylinný lék.

Pod obchodním názvem „Laetrile“ je amygdalin propagován zástupci „alternativní medicíny“ jako léčivo podobné vitamínu pod označením B_{17} a protirakovinné činidlo. V této funkci byl amygdalin kategoricky odmítnut vědeckou a lékařskou komunitou, zejména Americkou správou potravin a léčiv (FDA), Americkou onkologickou společností, Americkou lékařskou asociací (AMA) jako toxický a bez antitumorových účinku. Jsou známy případy otravy laetrem, včetně případů, kdy ji laetril užíván v kombinaci s vysokými dávkami vitamínu C, což snižuje hladinu cysteinu v tkáních, která váže kyanovodík *in vivo* (Bromley et al. 2005). Reklama na amygdalin jako protirakovinného činidla je považována za klasický a jeden z nejziskovějších příkladů využívání obav lidí o své zdraví.

Ačkoli laetril a amygdalin jsou kyanogenní glykosidy, jedná se o různé látky. Přírodní amygdalin existuje jako pravostranná struktura (R-amygdalin), která je aktivní formou. Název „Laetril“ je zkratkou, která je odvozena ze slov „laevorotatory a mandelonitrile“. Laetril, který ji předmětem amerického patentu, je polosyntetický derivát, jehož struktura je D-mandelonitril-

β -glukóza, liší se však od struktury amygdalinu (D-mandelonitril- β -gentiobiosid). Na obrázku 5 jsou rozdíly v chemických strukturách amygdalinu a laetrilu (Salama et al. 2019).



Obrázek 5. Laetril a amygdalin

Otázka protirakovinové aktivity amygdalinu/laetrilu zůstává otevřená. Protože vědci mají stále odlišné názory na protinádorový účinek amygdalinu. Sporné ji též zařazení amygdalinu do skupiny vitaminů B pod názvem B₁₇.

Vitamíny jsou organické sloučeniny, které jsou v malém množství potřebné pro normální fungování těla. Jsou nezbytné pro růst, vývoj a udržení dobrého zdraví. Vitamíny se dělí do dvou skupin: vitamíny rozpustné v tucích a vitamíny rozpustné ve vodě. Vitamíny hrají zásadní roli v mnoha fyziologických procesech v těle, včetně metabolismu, růstu a vývoje, imunitních funkcí a neurologických funkcí. Každý vitamín má jedinečnou funkci a jeho nedostatek může vést ke specifickým zdravotním problémům. Dietní zdroje vitaminů zahrnují různé potraviny, jako jsou ovoce, zelenina, celozrnné výrobky, mléčné výrobky a maso. Množství a dostupnost vitaminů v potravinách mohou být ovlivněny faktory, jako jsou zpracování, vaření a skladování. Hlavním úkolem vitaminů skupiny B je účast v koenzymech v mnoha enzymatických procesech, především v neustálé obnově živé hmoty. S jejich nedostatkem dochází ke snížení aktivity některých enzymů, a tím k inhibici specifických metabolických procesů. V případě B-avitaminózy experimentální zvířata vykazují významné poškození reprodukční funkce, což je v souladu s dobře známou skutečností o účasti enzymů na řízení jednotlivých fází reprodukčního procesu. Vitamíny skupiny B jsou mírně odlišné ve svých chemických vlastnostech a biologických mechanismech účinku.

Amygdalin nespĺňuje všechny podmínky pro to, aby mohl být nazýván vitaminem. To však nevylučuje skutečnost, že tato látka může mít v jistém smyslu pozitivní vliv na lidský organismus.

Skupina čínských vědců aktivně studuje vlastnosti amygdalinu. Amygdalin se používá v tradiční čínské medicíně a studie vědců tvrdí, že tato látka úspěšně pomáhá při léčbě rakoviny (Lea & Koch 1979; Xing & Yang 2003; Chen et al. 2013).

Li et al. (2019) píše, že β -glukosidáza je enzym, který uvolňuje glukózu hydrolýzou glykosidické vazby mezi cukry a arylovými skupinami. Interakce mezi cukry a arylovými skupinami indukuje vznik β -glukosidázy, která současně inhibuje oxidázu cytochromu c, jež je koncovým enzymem mitochondriálního respiračního řetězce, a tím se ukončuje syntéza adenosin trifosfátu. Celý proces vede k buněčné smrti v důsledku vzniku velkého množství kyseliny kyanovodíkové. Normální buňky obsahují enzym rhodanázu pro přeměnu kyseliny kyanovodíkové (CN⁻) na netoxickou kyselinu thiokyanatou (SCN⁻), která v nádorových buňkách chybí, a proto může být kyselinou kyanovodíkovou nádorová buňka specificky

zničena. Pro aktivaci enzymu rhodanázy v těle teplokrevného živočicha, včetně člověka, je však nutná expozice z vnějšku, tj. přítomnost antidota. Tím je látka thiosulfát. To je v rozporu s údajem Jamesa (2002) podle něhož nádorové i normální buňky obsahují pouze stopy β -glukosidáz a stejná množství rhodanázy.

Li et al. (2019) naznačují, že vztah mezi β -glukosidázou a amygdalinem by mohl vyvolat specifický protinádorový účinek. Kyselina kyanovodíková může působit nespécificky na buněčný cyklus, a tím zabít rakovinné buňky. Když je β -glukosidáza spojena s monoklonální protilátkou specifickou pro nádor, může být amygdalin přeměněn na aktivní lék, který specificky usmrcuje nádorové buňky.

Li et al. (2019) dále zjistili, že benzaldehyd, produkt amygdalinu rozložený enzymy, může inhibovat aktivitu pepsinu a je účinný při chronické atrofické gastritidě, která snadno přechází do rakoviny žaludku. Tyto výsledky naznačují, že určitá koncentrace amygdalinu může selektivně zabít nádorové buňky v těle působením β -glukosidázy s nevýznamnými klinickými nepříznivými účinky a že amygdalin může generovat kyselinu kyanovodíkovou působením lidské β -glukosidázy a konkrétně zabít nádorové buňky.

Amygdalin je glykosid, který se v těle hydrolyzuje za vzniku kyanovodíku a benzaldehydu. Kyanidový iont generovaný rozkladem amygdalinu inhibuje buněčné dýchání vazbou na cytochrom c oxidázu, což vede ke snížení produkce ATP a nakonec k buněčné smrti. Bylo navrženo, že rakovinné buňky jsou náchylnější k cytotoxickým účinkům kyanidu v důsledku jejich zvýšené závislosti na glykolýze při výrobě energie.

V souvislosti s účinkem amygdalinu na tumorové buňky je nutno se zmínit o Warburgově efektu. Warburgův efekt je tendence většiny rakovinných buněk produkovat energii hlavně prostřednictvím velmi aktivní glykolýzy s následnou tvorbou mléčné kyseliny, a nikoli prostřednictvím pomalé glykolýzy a oxidace pyruvátu v mitochondriích pomocí kyslíku jako ve většině zdravých buněk. V buňkách rychle rostoucího zhoubného nádoru je rychlost glykolýzy téměř 200krát vyšší než ve zdravých tkáních. V tomto případě zůstává glykolýza výhodná i za podmínek, kdy je nadbytek kyslíku (Alfarouk et al. 2011).

Hlavním toxickým účinkem na rakovinnou buňku je působení kyseliny kyanovodíkové nebo od ní odvozeného kyanidového iontu, který blokuje oxidační fosforylaci v mitochondriích. Kyanidový ion, který má afinitu k trojmocnému železu, blokuje cytochromoxidázu, tj. nejdůležitější mitochondriální enzym obsahující železo, který katalyzuje konečný stupeň oxidační fosforylace. Výsledkem je, že syntéza molekul 36 ATP je v buňce náhle zastavena. Z tohoto důvodu se tkáňové dýchání přerušuje a rychle dochází ke smrti buněk, primárně centrálního nervového systému, jako nejcitlivějšího systému na nedostatek kyslíku. Zbývající neporušená anaerobní glykolýza, která vede pouze k 2 molekulám ATP, nemůže poskytnout buňkám dostatečné množství energie, proto při akutní otravě kyanidem dochází k rychlé smrti. Rakovinné buňky potřebují ale mnohem méně kyslíku, protože jejich hlavním zdrojem energie je intenzivní proces glykolýzy, proto je velmi problematické způsobit smrtelné otravy kyanidy v přítomnosti nádorových buněk.

V současné vědecké literatuře jsou ve velké míře popisovány výhody amygdalinu v léčbě rakoviny (Makarević et al. 2014; Milazzo & Horneber 2015; Abboud et al. 2018). V pracích z let 1970 – 2000 jsou naopak uvádějí argumenty proti protinádorové aktivitě amygdalinu a zejména laertilu (Lehmann 1977; Biaglow & Durand 1978; Moertel et al. 1982).

Pravidelná konzumace přiměřeného množství ovoce a zeleniny může snížit výskyt rakoviny a tento důkaz vyvolal zájem o terapeutické využití těchto potravin jako přirozených zdrojů protirakovinných látek. Tato možnost vyvolala pozornost výzkumníků a v současnosti obrovské množství důkazů podporuje protirakovinné působení přirozeně se vyskytujících sloučenin. V posledních několika letech došlo k významnému pokroku v analýze biologické aktivity přírodních sloučenin v modelech *in vitro* i *in vivo*. Léčba s použitím amygdalinu lidských rakovinových buněčných linií jako MCF-7 (rakovina prsu), A549 (rakovina plic) a HT-29 (rakovina tlustého střeva) byly studovány *in vitro*.

V studii Cecarini (Cecarini et al. 2022) zkoumali účinek amygdalinu a dvou vodných extraktů z meruňkových jader na funkčnost proteolytických systémů (podrobně proteazom a autofagii) a implikace na apoptotické děje v buňkách lidského karcinomu prsu a u normálních zdravých buňek. Nádorové buňky ošetřené vodnými extrakty a amygdalinem vykazovaly srovnatelné snížení životaschopnosti buněk (o 30 – 40 %). U normálních buněk nebyly zjištěny žádné změny životaschopnosti. Expresí jaderného antigenu proliferující buňky, což je index buněčné proliferace, byla ovlivněna ošetřením amygdalinem a jedním z vodných extraktů z meruňkových jader. Účinky amygdalinu a obou extraktů byly poté testovány na funkčnost proteazomu měřením aktivity jak katalytického jádra, tak proteazomu. Oba proteolytické komplexy byly inhibovány v rakovinových buňkách ošetřených amygdalinem a jedním z vodných extraktů z meruňkových jader. Inhibice proteasomálního komplexu byla potvrzena akumulací proteinů zapojených do buněčného cyklu a apoptotického procesu, což naznačuje možnou aktivaci této dráhy buněčné smrti. Data Cecarini (Cecarini et al. 2022) ukazují schopnost amygdalinu uplatnit svůj účinek prostřednictvím modulace aktivity proteazomu a jejích katalytických složek.

Bylo provedeno mnoho dalších studií zkoumajících potenciální protirakovinné vlastnosti amygdalinu. Studie *in vitro* prokázaly, že amygdalin může indukovat apoptózu, inhibovat buněčnou proliferaci a potlačovat angiogenezi v řadě rakovinových buněčných linií, včetně rakoviny prsu, plic, tlustého střeva a prostaty. Slibné výsledky ukázaly i studie na zvířatech, přičemž amygdalin prokázal protinádorové účinky u myši s implantovanými xenoinplantáty lidských nádorů (Milazzo et al. 2011). Navzdory slibným předklinickým údajům přinesly klinické studie zkoumající účinnost amygdalinu jako protirakovinného činidla má smíšené výsledky. Některé studie zaznamenaly zlepšení přežití a kvality života u pacientů s rakovinou léčených amygdalinem, zatímco jiné neprokázaly žádný přínos nebo dokonce informovaly o negativním dopadu na zdraví pacientů. Tyto protichůdné výsledky mohou být způsobeny rozdíly v designu studie, výběru pacientů a použití různých formulací amygdalinu.

Jedním z hlavních problémů s použitím amygdalinu jako léčby rakoviny je jeho potenciální toxicita. Kromě toho bylo použití amygdalinu spojeno s vedlejšími účinky jako je nevolnost, zvracení, závratě a bolesti hlavy.

Kromě toho klinické studie na lidech nepotvrzují účinnost laetilu. Milazzo et al. (2007) píše, že systematický přehled jakýkoliv typů klinických důkazů souvisejících s účinností nebo bezpečností laetrilu (nebo intervencí amygdalinu) u pacientů všech věkových skupin trpících rakovinou jakéhokoliv typu nebo stádia, nenalezl žádný spolehlivý důkaz, že laetril je účinný jako protirakovinový lék. Tvzení, že laetril má protirakovinné účinky, proto není podloženo údaji z kontrolovaných klinických hodnocení. V malém počtu zpráv se však předpokládá, že laetril je přínosem pro pacienty s rakovinou. Je třeba ovšem zdůraznit, že v nejlépe hodnotících

studiích a zprávách není znám počet léčených případů, proto tyto typy přehledů mohou generovat falešně pozitivní celkový dojem. Všechny pozitivní výsledky pocházely ze studií, kde subjektivní reakce mohly být chybně interpretovány jako objektivní důkaz účinnosti. Mnoho případů uvádějících regresi nádoru odkazovalo na dočasnou regresi a v případech údajné úplné remise žádná ze studií neposkytla podrobné informace o následném stavu. Někteří pacienti, u kterých došlo k regresi nádoru, mohli také podstoupit konvenční léčbu.

Ve studiích z poslední doby protinádorové pro člověka účinky amygdalinu byly prokázány *in vitro* bez experimentů *in vivo*. Kromě toho, amygdalin v dávkách, které byly použity, vyvolal málo klinických vedlejších účinků. Bylo zjištěno, že hladina kyanidu vzrostla na $2,1 \text{ mg.ml}^{-1}$ v krvi jedinců, kteří podstoupili orální léčbu amygdalinem (0,5 g), aniž by vykazovali významné známky nepohodlí a všechny ostatní parametry měli v normě. Pouze u jednoho pacienta se objevily příznaky otravy kyanidem v důsledku podání nadměrné dávky amygdalinu (1,0 g). U tohoto jedince dosáhla hladina kyanidu v krvi $3,5 \text{ mg.ml}^{-1}$. Tato studie ukázala, že amygdalin je bezpečný pro pacienty s pokročilým karcinomem (Li et al. 2019).

Zastánci laetrilu a amygdalinu navrhli různé teorie vysvětlující jeho údajnou protirakovinnou aktivitu.

- Jednou z nich je „trofoblastická teorie rakoviny“. Tato teorie říká, že všechny rakoviny vznikají z primordiálních zárodečných buněk (buňky, které by normálně daly vznik vajíčkům nebo spermím), z nichž některé se během embryogeneze rozšíří po celém těle, a proto nejsou omezeny na varlata nebo vaječníky. Užívání laetrilu se vysvětluje domněnkou, že maligní buňky jsou specifické v tom, že mají vyšší hladiny enzymu zvaného beta-glukuronidáza, než je obvyklé, a že jsou defektní v jiném enzymu zvaném rhodanáza (thiosulfátsulfurtransferáza). Jiný názor uvádí, že laetril je modifikován v játrech a poté enzym beta-glukuronidáza modifikovanou sloučeninu rozloží za vzniku kyanidu. Poté rhodanáza přemění kyanid na relativně neškodnou sloučeninu thiokyanát. Nerovnováha těchto dvou enzymů tedy ukazuje, že rakovinné buňky jsou více ovlivněny toxickými účinky laetrilu než normální buňky.
- Jiná teorie tvrdí, že laetril neboli amygdalin/vitamín B₁₇ je chybějící vitamín, který tělo potřebuje k obnovení zdraví. V souladu s tím tato teorie předpokládá, že rakovina je metabolická porucha způsobená nedostatkem vitamínu. Navzdory experimentálním důkazům, které naznačují, že míra příjmu jednotlivých vitamínů může ovlivnit vznik rakoviny, neexistuje žádný důkaz, že by laetril byl nezbytný pro normální metabolismus.
- Existuje také teorie, která naznačuje, že kyanid uvolněný z laetrilu zvyšuje kyselý obsah nádorových buněk, což vede k narušení lysozomů uvolňujících svůj obsah. Tím se zastaví růst nádoru a zničí rakovinné buňky. Podle této teorie je dalším důsledkem destrukce lysozomů je stimulace imunitního systému.
- Amygdalin by navíc mohl výrazně snížit působení enzymu telomerázy, který se vyskytuje ve vyšších hladinách v rakovinných buňkách (8 – 13krát). Proto snižuje expresi telomerasové reverzní transkriptázy a telomerasové RNA složky. V důsledku toho může způsobovat potlačení růstu rakovinných buněk (Salama et al. 2019).

Však na základě analýzy dostupné literatury je zřejmé, že je potřeba mnohem více studií a hlavně klinický ověřených a dobře kontrolovaných k objasnění farmakologických mechanismů amygdalinu, pokud jde o optimální dávku, proveditelnost kombinovaného použití amygdalinu s jinými protinádorovými léky, a dokonce i laboratorní syntézu aktivní složky v amygdalinu, za účelem posílení jeho protinádorového účinku a snížení jeho nepříznivých účinků pro klinické použití.

Stojí za zmínku, že i přes protichůdné výsledky existujících experimentů a studií je amygdalin rozhodně zajímavý nejen pro farmakologický ale i pro potravinářský průmysl, protože amygdalin se nachází v rostlinách, které lidé používají k jídlu nebo hospodářská zvířata dostávají v krmné dávce.

3.3.2 Vedlejší produkty ovocnářství

Každý rok se vyprodukuje velké množství ovoce, které se vyplývá, protože přebytek nelze spotřebovat nebo ovoce patří do druhé, třetí kategorie jakosti. Podle FAO (The State of Food and Agriculture 2019) 21,6 % vyprodukovaného ovoce na světě se vyhodí, a to počínaje fází po sklizni až po distribuci. Velmi často je ovoce odmítáno jen kvůli jeho „nedokonalému“ vzhledu nebo nedostatečné velikosti, i když je ovoce dokonale jedlé. Je pravda, že i když existují alternativy, jako je výroba ovocných protlaků, džusů nebo dokonce ovocných džemů, stále se plýtvá velkým množstvím, protože ovoce zůstává na polích, dokud se nerozloží nebo okamžitě se likviduje jako odpad. Tyto akce vedou k ekologickým i ekonomickým problémům, proto znečištění životního prostředí a rostoucí ceny mohou vést k nadprodukcí ovocí.

Některé druhy ovoce mají silnou a drsnou slupku, jako je granátové jablko, zatímco některé druhy ovoce mají tenkou slupku, jako je mango. Většinu ovocných slupek spotřebitelé nekonzumují kvůli hrubé textuře a hořké chuti. Ostatní vedlejší produkty z ovoce, jako jsou semena, se většinou konzumují spolu s ovocem, například u melouna a kiwi. Oproti tomu semena větší velikosti se nekonzumují a většinou se po konzumaci dužiny vyhodí. Ovocná semena jsou bohatá na nutriční zdroje a byla použita k vývoji funkčních potravin. Ovocné výlisky jsou zbývající pevnou hmotou po extrakci ovocné šťávy a mohou zahrnovat semena, slupky, dužniny a stonky u některých druhů ovoce. Například jablečné výlisky tvoří ~25 % jablek, kde odpady z výroby jablečné šťávy a moštu mohou vytvářet obrovské množství výlisků. Plýtvání jablečnými výlisky je obzvláště vyšší v západních zemích, jako jsou Německo a Nový Zéland (Lau et al. 2021).

Jedním z možných využití zbytků z ovocnářského průmyslu je zpracování macerovaných octů s použitím různých částí ovoce. Některé příklady octové macerace s ovocem, jako jsou banán, mučenka nebo jablko lze nalézt v literatuře (Luzón-Quintana et al. 2021). Macerace není jediným způsobem, jak využít odpad po zpracování ovoce. Dietní vláknina, která byla extrahována z těchto odpadů může být použita k obohacení jiných potravin. Dietní vláknina získaná z ovoce je v dnešní době stále více uváděna na trh kvůli její vyšší nutriční kvalitě ve srovnání s dietní vlákninou získanou z obilovin (Luzón-Quintana et al. 2021).

Ovocné vedlejší produkty jsou považovány za bohatý zdroj organických kyselin, minerálů, pigmentů a fenolických sloučenin. Navzdory obsahu bioaktivních sloučenin jsou vedlejší ovocné produkty náchylné ke zkažení nebo k produkci nežádoucí chuti kvůli většímu

mikrobiálnímu a organickému obsahu. Proto se vyžaduje, aby vedlejší produkty z ovoce byly před použitím zpracovány v potravinářských aplikacích (Saleh et al. 2021).

V rostlinné říši jsou fenolické sloučeniny nejrozšířenějšími sekundárními metabolity, které přispívají ke zdraví rostlin i lidí. Polyfenoly, jako jsou flavonoidy, hrají v rostlině četné molekulární a biochemické role. Slouží pro signalizaci, obranu rostlin, zprostředkování transportu auxinu, antioxidační aktivitu a vychytávání volných radikálů. Vzhledem k tomu, že zbytky plodů jsou snadno dostupné, jsou používány jako levné hnojivo. Studie ukázaly (Sagar et al. 2018), že v semenech a slupkách plodů je přítomno značné množství bioaktivních sloučenin a základních živin. Tak spotřeba syntetických přísad jako jsou antioxidanty v potravinách je stále omezenější kvůli obavám z potenciálních nepříznivých účinků na lidské zdraví. Používání přírodních antioxidantů je životně důležité, jelikož nejsou rizikové na rozdíl od syntetických přísad. Mezi příznivé zdravotní vlastnosti přírodních bioaktivních sloučenin patří antibakteriální, protinádorové, antivirové, antimutagenní a kardioprotektivní účinky (Saleh et al. 2021). Využití vedlejších produktů ovocnářství pro tyto účely má ekonomický a humanitární potenciál.

Vědecký vývoj v oblasti extrakce biologicky aktivních molekul, zaznamenaný v posledních desetiletích, umožňuje zhodnocení a následné využití vedlejších produktů zpracování ovoce. Tisíce cenných molekul generovaných z ovocného odpadu lze využít v potravinářském, kosmetickém nebo farmaceutickém průmyslu. Aby bylo možné získat produkty s přidanou hodnotou, je podstatné vypracování metod extrakce pro každý vedlejší produkt generovaný v zemědělsko-potravinářském průmyslu. Tradiční metody se stále používají, i když způsobují vysokou spotřebu energie a někdy i degradaci termolabilních sloučenin. Trvale se vyvíjejí udržitelné metody prostřednictvím zlepšování a optimalizace stávajících procesů podle principů zelené chemie (Fierascu et al. 2020).

Terapeutické vlastnosti bioaktivních sloučenin pocházejících z ovoce jsou široce popsány ve vědecké literatuře. Řáda publikací uvádí protirakovinnou, antidiabetickou, antihypertenzní, protizánětlivou, antimikrobiální, antioxidační, imunomodulační nebo neuroprotektivní aktivitu rostlinných sekundárních metabolitů extrahovaných z ovoce a zdůrazňuje jejich význam v lidské stravě (Liu et al. 2019). Vědecké informace, které se týkají, biologických aktivit vedlejších produktů ze syrového ovoce jsou zaměřeny především na potravinářské aplikace. Antioxidační a antimikrobiální vlastnosti semen, dužiny, slupek nebo odpadu dužiny jsou zkoumány s cílem navrhnout nové funkční potraviny zlepšující lidské zdraví a pohodu (Liu et al. 2019). Vzhledem k tomu, že vedlejší produkty z ovoce jsou převážně výsledkem potravinářského průmyslu, aplikace potravinového odpadu ve stejném odvětví zajišťuje cirkulaci nadbytečné potravinové biomasy a usnadňuje nakládání s odpady. Nicméně, bez ohledu na výhody, které se získávají zpracováním vedlejších produktů z ovoce v potravinářském průmyslu, současné předběžné vědecké poznatky potvrzují, že odpad z ovoce lze považovat za cenný zdroj fyto-složek pro lékařské použití.

Je dobře známo několik aplikací sloučenin získaných z různých průmyslových odvětví. Sloučeniny získané z ovocných odpadů nacházejí další uplatnění jako aditiva v potravinářských produktech pro zachování a zvýšení kvality, pro prevenci oxidace potravin a pro inhibici růstu patogenních mikroorganismů (Andrade et al. 2019). Díky vlastnostem nepropustným pro kyslík, produkty získané z ovocných odpadů lze také použít jako substrát pro nové obalové materiály (Singh & Kaur 2015). Ovocné odpady v potravinářském průmyslu lze využít jako

náhražku pšeničné mouky (Struck et al. 2018), lze je přidávat do koláčů nebo je lze použít v nápojovém průmyslu (Reissner et al. 2019). Zájem o produkty na přírodní bázi se rozšířil i v kosmetickém průmyslu. Hledání nových léků a zvýšená rezistence vůči těm současným vedly k nalezení nových zdrojů antimikrobiálních látek, jako jsou znovuzískané bioaktivní sloučeniny z ovocného odpadu (Ruiz-Montañez et al. 2014). Zájem o využití biomasy pro výrobu energie se v posledních desetiletích stal důležitou strategií zaměřenou na snížení negativního dopadu fosilních paliv na životní prostředí. V této souvislosti produkty s přidanou hodnotou lze vyrábět za pomoci fermentace různých odpadů anaerobními bakteriemi, které lze integrovat do přítokového nebo kontinuálního systému pro výrobu lipidů nebo biopaliv (Liu et al. 2019).

Fierascu (Fierascu et al. 2020) uvádí, že díky bohatému složení na sacharózu, inulin, maltózu, glukózu, fruktózu, škrob, galaktózu, dextrózu nebo laktózu lze ovocný odpad využít jako substrát pro výrobu oligosacharidů nebo mikrobiálních polymerů. Agropřmyslový odpad, který lze k tomuto účelu využít, je právě ten, co je bohatý na sacharózu: slupky (agáve, mango, banán, ananas, pomeranč atd.), listy (banán atd.) nebo výlisky (výlisky z jablek a hroznů). Ovocné výlisky lze také použít k získání pektinu (využívá se v kosmetickém i potravinářském průmyslu) nebo bioetanolu, vodíku či metanu přes anaerobní fermentaci. Nejzajímavější způsoby využití odpadu z ovoce jsou ty, které zahrnují kaskádové přístupy transformace získaných sloučenin na jiné různé sloučeniny. Sloučeniny z vedlejších produktů ovoce (jako je celulóza nebo hemicelulóza) mohou být přeměněny na cukry, dále použity pro výrobu biopaliv a biochemikálií nebo použity pro aplikace, jako je katalýza, chemické senzory a molekulární separace.

Vedlejší produkty ovocnářství našly též uplatnění ve výrobě barviv a pigmentů. Zvyšující se zákonné požadavky a povědomí spotřebitelů v posledních letech povzbudily průmyslová odvětví k používání většího množství přírodních pigmentů. Nedávné studie se zaměřily na výrobu cenově výhodných přírodních pigmentů, nazývaných také pigmenty na biologické bázi. Přírodní pigmenty, které lze získat z rostlin, zvířat a mikroorganismů, jsou většinou biokompatibilní, biologicky odbouratelné, šetrné k životnímu prostředí a mají nízkou toxicitu. Produkce mikrobiálních pigmentů je považována za výhodnější vzhledem k jejich vyšší rychlosti růstu, skutečnosti, že nejsou ovlivněny sezónními změnami, a vysoké stabilitě produkovaných pigmentů. Potravinářské vedlejší produkty byly označeny za nízkonákladový substrát pro výrobu pigmentů. V poslední době v této souvislosti zemědělské nebo potravinářské vedlejší produkty, pocházející z průmyslových odvětví, získaly velkou pozornost, a to díky svému širokému využití pro získávání nových cenných produktů se strategií nulového odpadu (Arikan et al. 2020).

3.3.2.1 Použití semen jako vedlejších produktů ovocnářství

Diplomová práce se zabývá obsahem amygdalinu v semenech jablek a hrušek. Podle výše uvedených údajů lze říci, že vedlejší produkty ovocnářství široce využívány v moderním potravinářském, kosmetickém a farmaceutickém průmyslech. Proto znalost všech složek těchto vedlejších produktů je velmi důležitá. Například obsah amygdalinu v jablečných výliscích může ovlivnit růst mikroorganismů na jablečném substrátu nebo ovlivnit čistotu a bezpečnost výživových doplňků, které lze z jablečných výlisků získat. V této souvislosti se dá pokládat za

důležitou analýzu dostupných údajů o složení semen jablek a hrušek. Pro začátek je třeba se zaměřit na informace o využití semen jako vedlejších produktů ovocnářství.

Uvádí se (Lau et al. 2021), že semena ovoce a zeleniny obsahují vysoké množství vlákniny. Například obaly semen luštěnin mají vysoký obsah vlákniny v rozmezí od 65 do 86 %. Meruňková jádra jsou také potenciální funkční složkou potravin s vysokou nutriční hodnotou. Studie představené v literatuře prokázaly, že meruňkové jádro má vysoký obsah bílkovin. I když toto jádro kromě všeho obsahuje jako jablečné jádro amygdalin, používá se jako náhražka tuku v sušenkách a je začleněno do procesu výroby nudlí, chleba a sušenek. Semena ovoce byla rozsáhle studována. Například tuk extrahovaný ze semen rambutanu vykazoval vysokou tepelnou stabilitu, což naznačovalo jeho možné využití v potravinářském průmyslu. Mastné kyseliny tuků semen rambutanu se hlavně skládají z olejové kyseliny a arachidonové kyseliny, což jsou omega-9 a omega-6 mastné kyseliny. Kromě toho tuky ze semen rambutanu mají podobné složení mastných kyselin jako kakaové tuky, a lze je použít k nahrazení kakaového másla při výrobě čokolády.

Mnoho druhů ovocných semen a výlisků obsahuje velké množství fenolické sloučeniny, která disponuje silnou antiradikálovou aktivitou. Uvádí se, že některé ovocné slupky mají vysokou antioxidační aktivitu a jsou vhodné pro použití jako přírodní antioxidanty při vývoji funkčních potravin. Jablečné výlisky jsou dobrým zdrojem polyfenolů a vykazují silnou antioxidační aktivitu. Polyfenoly z jablečných výlisků vykazovaly silnější aktivitu v pohlcení radikálů než vitamin C a E, což naznačuje, že jablečné výlisky by mohly být potenciálním přírodním zdrojem antioxidantů (Walker et al. 2014). Fortifikací ovocnými výlisky se například zvýšil zdravotní přínos produktů, zejména pokud jde o antioxidační aktivitu, a zvýšila se nutriční hodnota produktů.

Skupina polských vědců sledovala zdravotní účinky stravy obsahující jablečnou moučku u potkanů. Jablečné výlisky obsahují semena, která jsou bohatá na bílkoviny, vlákninu a olej, které z nich lze extrahovat. Mohou však také obsahovat značné množství toxického amygdalinu. Opyd a kol. (Opyd et al. 2017) předpokládali, že amygdalin je sloučenina, která významně snižuje nutriční a zdravotní kvalitu odtučněných semen jablek. Experiment byl proveden na potkaních, které byli rozděleni do třech skupin a živili se stravou s vysokým obsahem fruktózy. V kontrolní a amygdalinové skupině byla celulóza a kasein zdrojem vlákniny a bílkovin. V amygdalinové skupině dietní vláknina pocházela z moučky z jablečných semen a bílkoviny z endospermu jablečných semen, které byly předem odtučněné a rozemleté. Ve výsledku experimentu se tvrdí, že doplnění stravy moučkou z jablečných semínek může mít příznivé účinky na střevní soustavu, profil krevních lipidů a antioxidační stav potkanů. Ve většině případů nejsou tyto účinky omezeny přítomností amygdalinu. Nutriční hodnota bílkovin z jablečného šrotu je však relativně nízká.

Nejběžněji konzumovaným ovocem na celém světě jsou jablka, hrozny a exotické ovoce typické pro danou oblast pěstování. Jablka jsou nejoblíbenějším ovocem, které poskytuje produkci šťávy a jablečného moštu ve více než 3 milionech tun v Evropě (Barreira et al. 2019) a asi 5 milionech tun ve Spojených státech každý rok (Niglio et al. 2019). Zbývajícím materiálem po zpracování jsou výlisky, které se skládají ze slupek, dužiny, zbytků dužiny, jádra se semeny a stonky, které jsou bohaté na polysacharidy, fenolové sloučeniny a fenolové kyseliny (Coman et al. 2019). Jablečné výlisky obsahují větší množství bioaktivních látek ve srovnání se šťávami ze samotného ovoce (Michalska & Łysiak 2014). Jablečné výlisky obsahují

vysoké množství vlákniny ve srovnání s jinými vedlejšími produkty z ovoce, jako je například citrusová kůra. Existují studie, které prokázaly, že jablečné výlisky byly použity jako funkční přísada a zdroj dodatečné vlákniny při výrobě sušenek, koláčů a chleba. Kromě toho byl pektin extrahovaný z jablečných výlisků použit jako alternativní zdroj želatinačního činidla, které se používá hlavně k výrobě džemu nebo želé (Lau et al. 2021).

3.3.3 Složení jablečných semen

Hrušky (*Pyrus communis* L.) a jablka (*Malus domestica* Borkh.) patří do stejného rostlinného podkmene *Malinae*, jejichž celosvětová produkce v roce 2021 dosáhla 23,4 a 81,8 milionů tun (The State of Food and Agriculture 2019).

Při výrobě šťávy a dalších výrobků semena hrušek a jablek se často vyhazují, což má za následek značné množství vedlejších produktů, znalosti o bioaktivních látkách, kterých jsou omezené.

V poslední době velké množství studií zdůraznilo užitečnost získávání bioaktivních sloučenin z ovocných semen, jako jsou esenciální mastné kyseliny, tokochromanoly, karotenoidy, fytoosteroly a skvalen (Gornas et al. 2014). Environmentální, ekonomické a nutriční faktory byly hlavním podnětem k formulaci vědeckých charakteristik vedlejších zemědělsko-průmyslových produktů pro alternativní použití. Agropřůmyslové vedlejší produkty jsou slibnými alternativními zdroji přírodních bioaktivních sloučenin, a proto přitahují zájem o využití v potravinářském, farmaceutickém, kosmetickém a bionaftovém průmyslu. Bylo prokázáno, že olej z jablečných semen má zajímavé vlastnosti vyplývající z jeho chemického složení a z hodnocení jeho biologických aktivit *in vitro*. Olej z jablečných semen byl téměř úplně aktivní vůči bakteriím, plísním, a kvasinky byly méně citlivé. Minimální inhibiční koncentrace oleje z jablečných semen se pohybovala od 0,3 do 0,6 mg.ml⁻¹. Pozorované biologické aktivity ukázaly, že olej má dobrý potenciál pro využití v potravinářském průmyslu a farmacii (Gornas et al. 2014).

Jabloně se pěstují ve většině mírných oblastí. Mezi všemi ovocnými stromy mírných zeměpisných šířek má jablon první místo, pokud jde o plochu výsadby a výnos. Produkce jablek v ČR je v rámci celého ovocnářství nejdůležitější. Jak uvádí Ministerstvo zemědělství v „Situační a výhledové zprávě“ za rok 2021 celková úroda jablek v ČR činila 207,3 tis. tun. V roce 2021 se jablka na celkové produkci ovoce z produkčních sadů podílela na úrovni 82 % a na tržbách ovocnářských podniků na úrovni 74 %. Dlouhodobě je u konzumních jablek vykazována záporná obchodní bilance, která se v posledních letech prohlubuje. Komodita jablka je u nás přímo ovlivněna produkcí jablek v Polsku, které je největším producentem jablek v rámci EU a jedním z největších na světě. V obchodní síti v ČR se v marketingovém roce 2021/2022 prodalo 109,2 tis. t., což představuje meziroční 3% zvýšení, z toho tuzemská konzumní jablka činila 51,6 tis. t. Podíl tuzemských jablek na maloobchodním trhu byl ze 47 % (Buchtová & Němcová 2021).

Jablka lze konzumovat syrová nebo zpracovaná v podobě alkoholických (sider) nebo nealkoholických nápojů (mošt, džus), jablečných omáček nebo džemů. Během zpracování jablek může dojít ke kontaminaci výrobků, včetně kontaminace amygdalinem.

Jedním z úkolů této diplomové práce bylo provedení analýzy semen vybraných odrůd jablek pěstovaných v České republice na přítomnost amygdalinu. HPLC je pro daný úkol

nejvhodnější, protože chemické složení semen jablek je poměrně komplikované, a tento typ analýzy umožňuje oddělit jednotlivé chemické látky od sebe navzájem. Nicméně je důležité vědět o ostatních složkách obsažených v semenech jablek a hrušek. Proto byly prozkoumány studie, které se této problematice věnovaly.

V semenech jablek bylo detekováno čtyřicet šest sloučenin, z nichž většina byla mastnými kyselinami, stanovenými jako jejich methylestery. Linolová kyselina byla nejvíce zastoupenou mastnou kyselinou, následovaná palmitovou, linolenovou, stearovou a olejovou kyselinami. Menší množství kyselin mezi 0,2 % a 4 %, tvořily eikosanová, dokosanová, hexanová, oktanová a heptadekanová kyseliny. Některé mastné kyseliny byly také detekovány jako přírodní ethyl-, butyl- a hexylestery, i když jsou zastoupeny v malém množství ve srovnání s volnými kyselinami. Linolová kyselina včetně esterů tvořila 51,2 % celkové těkavé frakce hexanového extraktu. V semenech byl také přítomen skvalen a nonakosan (3,4 %, respektive 3,6 %), které tvořily dvě hlavní složky frakce jiných než mastných kyselin. Semena také obsahovaly fruktózu, glukózu a sacharózu v poměru přibližně 2,5 : 2 : 1 (Yinrong Lu & Yeap Foo 1998). Získaná polární frakce obsahovala dvě hlavní sloučeniny: amygdalin a florizin, přičemž florizin tvořil přibližně 75 % celkových polyfenolů, poté následovaly floretin-2'-xyloglukosid (cca 9 %) a quercetin-3-galaktosid (cca 6 %). Málo zastoupenými složkami, které byly detekovány, jsou chlorogenová a p-kumarylchinová kyseliny, 3-hydroxyfloridzin, floretin-2'-xyloglukosid a šest kvercetinových glykosidů, a to jsou arabinosid, galaktosid, glukosid, rhamnosid, rutinosid a xylosid (Yinrong Lu & Yeap Foo 1998).

V novější práci „Fatty Acids Composition of Apple and Pear Seed Oils“ (Rui Y et al. 2009) jsou uvedena další data (tab. 1, 2).

Tab.1 Složení mastných kyselin oleje ze semen jablek a hrušek (Rui Y et al. 2009)

Typ mastných kyselin	Olej z jablečných semínek (g/100g oleje)	Olej z hrušek (g/100 g oleje)
C16:0	5,606	6,388
C16:1	0,060	0,119
C18:0	1,466	1,746
C18:1	26,473	20,281
C18:2	43,031	56,801
C18:3	0,600	0,320
C20:0	1,311	1,251
C20:1	0,391	0,275
C20:2	0,043	0,050
C22:0	0,270	0,238
C24:0	0,089	0,109
Celkové mastné kyseliny	79,340	87,578

Tab. 2 Nasycené, nenasycené a mononenasycené mastné kyseliny v oleji ze semen jablek a hrušek (Rui Y et al. 2009)

Typ mastných kyselin	Olej z jablečných semínek (g/100g oleje)	Olej z hrušek (g/100 g oleje)
Nasycené mastné kyseliny	8,742	9,732
Nenasycené mastné kyseliny	70,598	77,846
Mononenasycené mastné kyseliny	26,924	20,675

Ve srovnání s výzkumem Yu (2005), Li (2003) a Lu (1998) bylo v této studii nalezeno dalších šest mastných kyselin z jablečného oleje a koncentrace C18:1 a C18:2 byly mnohem vyšší než jejich údaje, může k těmto změnám přispívat vyšší extrakční teplota a zdroj plodů.

Obsah bílkovin, vlákniny a popela byl zjištěn takto: 38,85 – 49,55 g.100⁻¹ g, 3,92 – 4,32 g.100⁻¹ g a 4,31 – 5,20 g.100⁻¹ g (Le K-X et al. 2010).

3.3.3.1 Složení hruškových semen

Hruška (*Pyrus communis L.*) patří do čeledi *Rosaceae* dvouděložných rostlin, původem ze západní Evropy, Číny, severní Afriky, Pákistánu a Asie. Mezi pěstovaným ovocem zaujímá 2. místo ve výživě hned po jablku (Mohammed & Muhsin 2020). Obvykle se nazývá obyčejná hruška nebo evropská hruška. Hruška je léčivou rostlinou, která se běžně používala již od pravěku. Obsahuje mnoho antioxidantů, které poskytují několik zdravotních výhod a bojují proti různým degenerativním poruchám. Hruška má velkou nutriční hodnotu a některé léčivé vlastnosti: sedativní, protizánětlivé, antioxidační, antipyretické, hypolipidemické, proti stárnutí, hypoglykemické, analgetické, antitusické, spasmolytické, protiprůjmové, antimikrobiální, hojení ran a hepatoprotektivní (Mohammed & Muhsin 2020). Je dobrým zdrojem kvercetinu, mědi a vitamínu C, které zabraňují poškození buněk volnými radikály.

Hruška je sladce šťavnaté ovoce s máslovou a třpytivou texturou. Je to středně velký strom o průměru 1 – 4 cm a výšce 10 – 17 m s protáhlou bazální částí. Listy jsou jednoduché, 2 – 12 cm dlouhé, leskle zelené, střídavě uspořádané a široce oválného tvaru. Dužnina je aromatická, bílá, sladká, obsahuje málo malých hnědých semen. Konzumuje se čerstvá, konzervovaná, sušená, může být z ní vyráběn i džus. Plodem je pyriformní malvice s opadavým nebo vytrvalým kalichem, 4 – 12 cm dlouhý, suchý, krupičkovitý a zelenavě zbarvený.

Mnoho studií zjistilo, že pravidelná konzumace hrušek může snížit riziko cukrovky, obezity a srdečních chorob. Také reguluje hladinu tekutin v těle, posiluje imunitní systém, zvyšuje hladinu energie a metabolismus (Mohammed & Muhsin 2020).

Produkce hrušek k 1.9.2022 byla odhadována na 6 719 tun, což představuje ve srovnání s pětiletým průměrem 4 % nárůst. Vlivem nepříznivého jarního počasí ve většině pěstitelských oblastí u hrušní došlo k velmi silnému propadu plůdků, nejvíce byla poškozena oblast severních Čech. Zatímco v ČR lze sklizeň hrušek označit za relativně uspokojivou, sklizeň hrušek v EU se potýkala s extrémně suchým a horkým počasím, v důsledku čehož hrušky nedorostly v mnoha případech do větších tržních kalibrů (Buchtová & Němcová 2021).

Pyrus communis obsahuje mnoho aktivních složek, jako jsou glykosidy, minerály, vitamíny, aminokyseliny, flavonoidy, mastné kyseliny, alkaloidy, trísloviny a polyfenoly. V HPLC analýze byly deriváty flavonolových glykosidů, trihydrát rutinu (Quercetin-3-rutinosid-

trihydrát) a hydrát rutinu (Quercetin-3-rutinosid-hydrát) identifikovány jako minoritní fenolové sloučeniny, zatímco chlorogenová kyselina a arbutin byly identifikovány jako hlavní fenolické sloučeniny v kůře a dužině (Mohammed & Muhsin 2020). Chlorogenová kyselina působí jako antioxidant, potenciální chemopreventivní činidlo, může podporovat prevenci chronických onemocnění, jako jsou kardiovaskulární onemocnění, posiluje imunitní systém, má protirakovinnou aktivitu, snižuje toxicitu chemoterapeutických léků (Mohammed & Muhsin 2020). Další důležitá fenolová sloučenina zastoupená v hrušni působí jako antibakteriální a bělicí činidlo pro lidskou pokožku, snižuje melanin v kůži (Mohammed & Muhsin 2020).

Ve studii Górnas (Górnas et al. 2016) byla analyzována semena 8 druhů hrušek. Složení jednotlivých mastných kyselin v semenných olejích, získaných z osmi druhů hrušek, bylo ve většině případů významně odlišné ($p \leq 0,05$). Ve všech studovaných vzorcích byly identifikovány pouze čtyři mastné kyseliny. To jsou palmitová, stearová, olejová a linolová. Pět mastných kyselin palmitolejová, α -linolenová, arachidová, gondoová a behenová byly detekovány v malých množstvích (0,19 – 1,08 %) a v několika, ale ne ve všech studovaných vzorcích. V olejích z hrušek převažovaly nenasycené mastné kyseliny typů C18:2 (50,73 – 63,78 %) a C18:1 (27,39 – 38,17 %). Z nasycených mastných kyselin nejvyšší množství bylo zaznamenáno u typů C16:0 (6,13 – 8,52 %) a C18:0 (1,04 – 1,31 %). Podobný profil mastných kyselin v oleji z hrušek byl popsán dříve. Srovnatelné složení mastných kyselin bylo také popsáno u olejů získaných z jiných rostlinných semen, patřících do čeledi *Rosaceae*, jako je jablko (*Malus domestica.*), kdoule (*Cydonia oblonga Mill.*) a kdoule japonská (*Chaenomeles japonica (Thunb.) Lindl. ex Spach*) (Fromm et al. 2012).

Ve všech analyzovaných vzorcích byly detekovány 4 homology tokoferolu a 2 tokotrienoly. γ -tokoferol byl převládajícím tokochromanolem (87 – 89 %). Shodné procentuální rozpětí bylo dříve hlášeno u semen hrušek, kde se před získáním tokochromanolů uplatňovala procedura saponifikace. Významná dominance γ -tokoferolu byla také hlášena v jiných semenech ovoce a jádrech rostlin patřících do čeledi *Rosaceae* (Górnas et al. 2016).

V semenech z hrušek bylo identifikováno 7 sterolů (kampesterol, β -sitosterol, Δ 5-avenasterol, cholesterol, gramisterol, Δ -stigmasterol a citrostadi-enol). β -sitosterol byl převládajícím steroidem v každém druhu a tvořil 83 – 88 % celkových detekovaných sterolů. Převaha β -sitosterolu byla také zaznamenána v semenech jablek.

Olej ze semen hrušek se vyznačoval výrazným množstvím karotenoidů, 0,0151 mg.g⁻¹ oleje (střední hodnota). Obsah skvalenu byl srovnatelný a pohyboval se od 0,255 do 0,408 mg.g⁻¹ oleje ze semen hrušek (Górnas et al. 2016).

3.3.3.2 Amygdalin v jablkách a hruškách

Bylo hlášeno, že konzumace kyanogenních rostlin, jako jsou kořen manioku, mandlová nebo meruňková jádra, způsobuje akutní a subakutní zdravotní problémy (v závislosti na dávce), například bolest hlavy, nevolnost, zvracení, křeče v břiše, závratě, slabost, duševní zmatenost, srdeční zástavu, oběhové a respirační selhání, kóma a v extrémních případech smrt (Geller et al. 2006). Aby se zabránilo toxicitě kyanidu, po staletí byly používány zpracovatelské postupy, jako jsou loupání, drcení, mletí, strouhání, máčení, fermentace a sušení, aby se snížila potenciální toxicita před konzumací. Cílem těchto postupů je snížit toxicitu, buď ztrátou ve

vodě rozpustných glykosidů, nebo maximální tvorbou HCN působením rostlinných nebo mikrobiálních enzymů a ztrátou HCN do atmosféry před konzumací.

Obsah amygdalinu se mezi různými druhy *Rosaceae* významně liší. Ačkoli jablka jsou bohatým zdrojem vitamínů a dalších živin, jablečná semínka obsahují vysoké hladiny kyanogenních glykosidů. Obsah amygdalinu se v semenech jablek pohyboval od 1 do 4 mg.g⁻¹, zatímco obsah kyanogenních glykosidů v džusu byl v rozmezí 0,001 – 0,08 mg.ml⁻¹ (Bolarinwa et al. 2016). Obsah amygdalinu v semenech jablka a hrušky analyzovaných ve studii „Amygdalin content of seeds, kernels and food products commercially-available in the UK“ (Bolarinwa et al. 2014) činil 3,0 a 1,3 mg.g⁻¹.

Obsah amygdalinu v jablkách a hruškách může být ovlivněn několika faktory. Pokud jsou potraviny vyrobené z kyanogenních rostlin skladovány při pokojové teplotě (35 ± 2°C) obsah kyanidů je stálý. Při nízké teplotě (26 °C) obsah kyanidů v potravinách klesá. Kyanogenní glykosidy jsou obecně rozpustné ve vodě. Během vaření se značné množství kyanogenních glykosidů vyluhuje do vařící vody. Několik studií (Ferreira et al. 1995) popisuje snížení obsahu kyanidu ve vařených výrobcích. Pokud zvolený způsob zahrnuje zahřívání za sucha, tepla nebo při nízkém obsahu vlhkosti, je příjem kyanogenních glykosidů z vařených potravin omezen pouze na malé množství. Snížení obsahu kyanidů by mohlo být také důsledkem rozmanitosti, zralosti a velikosti produktů (Bolarinwa et al. 2016).

3.3.3.3 Obsah amygdalinu v rostlinách a ve zpracovaných produktech

Kyanogenní rostliny se jedí různými způsoby, některé se často konzumují bez semen (jablka, hrušky) a některé se obvykle konzumují se semeny (cukety, okurky), protože semena některých potravinářských rostlin se při zpracování vůbec neodstraňují. Neschopnost minimalizovat expozici amygdalinu (a následně kyanovodíku) by mohla mít za následek akutní a subakutní zdravotní problémy spotřebitelů.

Amygdalin se ve většině případů nachází v semenech různých rostlin. Semena zralé broskve obsahují v průměru 6,81 mg.g⁻¹ amygdalinu. V hořkých mandlových jádrech byly stanovené vyšší hladiny amygdalinu, a to až 58,08 mg.g⁻¹. Obsah amygdalinu 9,26 mg.g⁻¹ v sušině byl stanoven v hořké odrůdě *Sassari 11*. Naopak ve sladké odrůdě mandlí *Arrubia* stejnými autory bylo stanoveno 1,06 mg.g⁻¹ amygdalinu a v další sladké odrůdě *Texas* nebyl dokonce žádný amygdalin detekován (Usai & D'hallewin 1992). Ve sladkých odrůdách mandlí byly tedy obsahy amygdalinu nižší než v semenech dalších rostlin čeledi *Rosaceae*.

V tabulce 3 a 4 jsou uvedeny některé vybrané rostliny čeledi *Rosaceae*, jejichž plody jsou člověkem používány jako potrava a obsahují amygdalin, včetně jeho koncentrace. Obsah amygdalinu v semenech peckovin by mohl produkovat kyanid v rozmezí 0,01 – 1,1 mg ekv. kyanidu g⁻¹, tato hodnota je poměrně vysoká.

Tab. 3. Obsah amygdalinu v plodech rostlin čeledi *Rosaceae* (Manyakhin & Koldaev 2019).

Druh rostliny	Obsah amygdalinu [% podíl sušiny extrakčních látek]
Hořké mandle (<i>Amygdalae amarus L.</i>)	3

Střemcha obecná (<i>Prunus padus</i>)	1,65±0,15
Meruňka obecná (<i>Prunus armeniaca</i>)	1,44±0,12
Švestka domácí (<i>Prunus domestica</i>)	1,02±0,08
Višeň obecná (<i>Prunus cerasus</i>)	0,80±0,06
Višeň plstnatá (<i>Prunus tomentosa</i>)	0,12±0,01

Tab. 4. Obsah amygdalinu v semenech rostlin čeledi *Rosaceae* (Bolarinwa et al. 2014).

Druh rostliny	Obsah amygdalinu [mg.g ⁻¹]
Meruňka obecná	14.37 ± 0.28
Třešně (černá)	2.68 ± 0.02
Třešně (červená)	3.89 ± 0.31
Nectarinka (summer fire)	0.12 ± 0.01
Broskve	6.81 ± 0.02
Švestka (zelená)	17.49 ± 0.26
Švestka (černá)	10.00 ± 0.14
Švestka (fialová)	2.16 ± 0.02
Švestka (žlutá)	1.54 ± 0.02
Švestka (červená)	0.44 ± 0.04
Jablko (Royal Gala)	2.96 ± 0.02
Hruška (Conference)	1.29 ± 0.04

Obsah amygdalinu zjištěný v analyzovaných semenech plodů jiných, než *Rosaceae*, by mohl uvolnit mezi 0,001 a 0,2 mg.g⁻¹ ekvivalentu kyanidu, tato hodnota není zanedbatelná (Bolarinwa et al. 2014).

Tab. 4. Obsah amygdalinu v semenach rostlin non-*Rosaceae* (Bolarinwa et al. 2014).

Druh rostliny	Obsah amygdalinu [mg.g ⁻¹]
Cuketa	0.21 ± 0.13
Okurka	0.07 ± 0.02
Meloun (honey dew)	0.12 ± 0.07
Tykev (různé druhy)	0.07 ± 0.41

Obsah amygdalinu v různých zpracovaných produktech je uveden v tabulce 5. Analýza byla prováděná u komerční dostupných výrobků na trhu UK. Ovšem množství amygdalinu ve výrobcích dostupných na trhu ČR se mohou lišit, ale lze předpokládat, že rozdíl je malý v důsledku společných požadavků ke kvalitě potravin na evropském trhu. Mezi analyzovanými komerčně dostupnými produkty nejvyšší obsah amygdalinu měla lisovaná jablečná šťáva s 0,09 mg.g⁻¹, po ní pak následovaly lisovaná jablečná šťáva se šťávou z červené řepy (0,02 mg.g⁻¹), jablečné pyré (0,02 mg.g⁻¹) a ovocné smoothie (0,01 mg.g⁻¹). UHT jablečná šťáva obsahovala nejnižší obsah amygdalinu 0,004 mg.g⁻¹. Amygdalin nebyl detekován v cideru. V UHT jablečné šťávě a v cideru byly hladiny amygdalinu nízké pravděpodobně kvůli enzymatické degradaci a ztrátě během zpracování. Hladiny amygdalinu detekované v plátcích broskve a ve šťávě, plátcích meruněk a ve šťávě, broskvovém nápoji, plátcích švestek a ve šťávě byly 0,06, 0,05,

0,04 a 0,03 mg.g⁻¹ v daném pořadí. Přítomnost amygdalinu v broskvovém nápoji, meruňkách, sušených švestkách, plátcích broskve a ve šťávě může být důsledkem vysokého obsahu amygdalinu v jádrech meruněk a broskví.

Tab. 5. Obsah amygdalinu ve zpracovaných produktech (Bolarinwa et al. 2014).

Zpracované produkty	Obsah amygdalinu [mg.g ⁻¹]
Mandle (pražené)	0.12 ± 0.06
Mandlové mléko	0.05 ± 0.01
Mandlový kakaový dezert	0.04 ± 0.02
Mandlová mouka	0.03 ± 0.01
Jablečná šťáva (100% lisovaná)	0.09 ± 0.03
Šťáva z jablek a červené řepy	0.02 ± 0.02
Jablečná šťáva UHT (3 značky)	0.004 ± 0.01
Jablečné pyré	0.02 ± 0.01
Plátky meruněk z konzervy ve šťávě	0.05 ± 0.07
Cider (2 značky)	nd
Ovocné smoothie (pasterizované)	0.01 ± 0.02
Broskvový nápoj	0.04 ± 0.05
Plátky broskví ve šťávě	0.06 ± 0.01
Marcipán	0.02 ± 0.01
Semena dýně (pražené)	nd

Údaje v tabulce 6 odpovídají obsahu HCN vznikajícího z některých vybraných kyanogenních rostlin, které lidé konzumují jako potravu, a také používají pro krmení domácích zvířat. Z tabulky je zřejmé, že nejvíce kyanovodíku vzniká ze špiček nezralých výhonků, které jsou následovány peckami višní.

Tab. 6. Obsah HCN v kyanogenech některých rostlin (Velíšek 2009).

Původ	HCN [mg.kg ⁻¹ čerstvého materiálu]	Původ	HCN [mg.kg ⁻¹ čerstvého materiálu]
maniok jedlý (Kassava)		peckové ovoce	
listy	650-1040	hořké mandle	2800-3100
celé hlízy	550	meruňkové pecky	3200
kůra hlíz	840-2450	višňové pecky	3540
dřeň hlíz	100-330	dužnina višní	10
bambus		čirok obecný	
nezralé stonky	3000	mladé listy	600
špičky nezralých		klíčící rostliny	2400
výhonků	8000	luštěniny	
mučenka purpurová		fazol měsíční (semena)	100-4000
nezralé ovoce	700	fazol obecný (semena)	20
zralé ovoce	100	hrách setý (semena)	23

3.4 Metody stanovení amygdalinu

3.4.1 Metody extrakce amygdalinu

Extrakce chemických sloučenin z rostlinného materiálu je pracný proces. Krok přípravy vzorků pro extrakci a chromatografickou analýzu přitahuje pozornost výzkumníků, analytiků a společností vyrábějících analytická zařízení. Tento zájem ukazuje na důležitost a dopad této fáze analytického postupu na kvalitu získaných výsledků. Navíc vyplývá z obecné tendence používat rychlejší a efektivnější metody, které jsou v ideálním případě je šetrnější k životnímu prostředí.

Správná příprava materiálu pro výzkum a mnohá průmyslová odvětví, jako jsou farmacie, kosmetika a potravinářství, je základem při získávání a analýze složitých přírodních materiálů. Správná příprava vzorku může zvýšit účinnost extrakce biologicky aktivních sloučenin. Tyto přípravy zahrnují vážení, měření objemu, míchání, ředění, zahřívání, chlazení, frakcionaci, čištění a konzervaci. Vážení je první fází zodpovědnou za konečný výsledek analýzy. Základním úkolem je zajistit, aby byl pro analýzu odebrán správný počet vzorků. Měření objemu se používá pro kapalné a plynné vzorky. Míchání je jedním z kroků v počáteční přípravě vzorku. Musí zajistit homogenitu vzorku a používá se také při ředění vzorků. Zahřívání vzorku je nutné při rozpouštění nebo odstraňování vody z materiálu. Snížení teploty se používá pro konzervaci vzorku a například při lyofilizaci. Čištění vzorků a frakcionace jsou založeny na prosévání, filtraci, sedimentaci, odstředování, flotaci pěny, membránové filtraci, destilaci, odpařování a krystalizaci. Proces čištění je často spojen s extrakcí, tj. izolací analytů ze vzorku. Proto je možné rozlišovat techniku extrakce rozpouštědlem (např. kapalina – kapalina), extrakce pevnou fází nebo preparativní chromatografie. Všechny tyto činnosti ovlivňují konečný výnos analýzy.

Charakteristickým rysem rostlinného materiálu, kromě jeho variability a charakteristické strukturované buněčné struktury, je množství sloučenin s různými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, které se vyskytují v širokém rozmezí. Rostlinný materiál je velmi složitá matrice složená ze široké škály rostlinných metabolitů, látek se širokým rozsahem polarity. Patří mezi ně vosky, terpenoidy, lipidy, fenolické sloučeniny, nízkopolární alkaloidy, polární glykosidy, polární alkaloidy, sacharidy, peptidy a proteiny. Bioaktivní sloučeniny jsou primárně fenolické sloučeniny (včetně flavonoidů), saponiny, cyklotoly atd. Od dobrého způsobu přípravy rostlinného vzorku by se mělo očekávat, že bez ohledu na umístění dané sloučeniny v matrici, její typ nebo přítomnost jiných složek. V důsledku dobře zvolené metody předběžné přípravy vzorku se fytoaktivní složky stávají dostupnějšími a zároveň snadněji extrahovatelné (Krakowska-Sieprawska et al. 2022).

Různorodá chemická povaha kyanogenních glykosidů znamená, že extrakce a analýza jednotlivých sloučenin může být obtížná, a navíc za vhodných podmínek může dojít k rychlé degradaci. Celkový obsah HCN ve vzorcích rostlin je možné stanovit nepřímými metodami, jako je pikrátová metoda, při které se po hydrolýze odhaduje celkový obsah HCN.

Pikrátová metoda je obecná metoda, avšak tato metoda je méně přesná, protože se opírá o hydrolytickou reakci usnadněnou linamarázou. Linamaráza nebo beta-D-glukosidáza je

enzym, který se nachází v mnoha kyanogenních rostlinách. Přítomnost inhibitorů enzymů jako jsou astaniny tedy ovlivní hydrolýzu linamarinu, což může vést k negativní nebo extrémně nízké hodnotě hladin celkových kyanidů (Pramitha et al. 2021).

Ještě jednou metodou extrakce amygdalinu je metoda kyselé hydrolýzy. Je založena na kyanogenní reakci v kyselém roztoku a kolorimetrických měřeních se specifickou Königovou reakcí. Reakcí je oxidace kyanidu na chlorokyan chloraminem-T. Poté se chlorokyan nechá reagovat se směsí pyridinu a barbiturové kyseliny za vzniku purpurového zbarvení a změřit se spektrofotometrem. Tato metoda nevyžaduje přítomnost enzymů, ale je schopna měřit tři různé formy kyanidu ve vzorku (kyanogenní potenciál) (Pramitha, et al. 2021).

Cho et al. (2013) však odhadli celkový obsah HCN pomocí iontové chromatografie, ultrazvukové lázně nebo extrakce pevná látka – kapalina za pomoci mikrovln během extrakce, která může trvat 24 hodin.

Extrakce je první fází procesu vedoucího k izolaci sekundárních metabolitů z rostlinných materiálů. Soxhletová extrakce je klasická metoda používaná pro tento účel. Aparatura sestává z baňky, soxhletova přístroje a chladiče. Nejprve se uchycí do stojanu spodní baňku a naplní ji rozpouštědlem. Nad ní se připojují soxhlet a opatrně do něj se vkládá extrakční patronu s náplní. Rozpouštědlo ve spodní baňce se zahříváním odpařuje a kondenzuje uvnitř chladiče. Odtud kape na extrakční patronu a postupně zaplňuje soxhlet. Po dosažení hladiny přepadu rozpouštědlo odteče do spodní baňky a soxhlet se plní znovu. Tento postup se opakuje, dokud není extrakce dokončena. Výsledkem je, že Soxhletova extrakce je kontinuální diskretní metoda. Sestava ve skutečnosti funguje jako dávkový systém, protože extrakční činidla působí postupně. Přesto, protože extrakční činidlo recirkuluje vzorkem, systém také běží kontinuálně.

Při konvenční Soxhletově extrakci může dojít k tepelnému rozkladu tepelně molabilních cílových druhů, když jsou vzorky extrahovány při teplotě varu rozpouštědla po dlouhou dobu. Tradiční Soxhletův aparát postrádá míchání, které by mohlo pomoci urychlit proces (Rajesh et al. 2022). Při extrakce amygdalinu lze tuto nevýhodu celkem kvalitativně vyrovnat. Extrakce trvá 100 minut, což není dlouhá doba a umožňuje periodicky ručně přesouvat obsah.

Hlavní nevýhody Soxhletovy extrakce spočívají v tom, že se jedná o časově náročný proces za použití nákladných rozpouštědel, která musí být odpovídající kvality. Z těchto důvodů byly v posledních letech preferovány jiné metody, které jsou méně časově náročné a vyžadují menší objemy rozpouštědel (Rajaei et al. 2010). Mezi tyto metody patří extrakce superkritickou tekutinou (SFE), extrakce ultrazvukem (UAE), a zrychlená extrakce rozpouštědlem (ASE).

Ultrazvukem asistovaná extrakce (UAE) je ekologickou alternativou, která se stále více používá pro obnovu biomolekul v rostlinném materiálu. Ultrazvukové vlny vytvářejí tlak a kavitaci, což způsobuje prasknutí rostlinných buněk a usnadňuje extrakci požadovaných molekul. Ultrazvukové sondy jsou navrženy tak, aby byly ponořeny do vzorku a dodávaly intenzitu ultrazvuku přímo do kapalného vzorku, což zvyšuje extrakční výtěžky a reprodukovatelnost a zkracuje dobu extrakce. Ve srovnání s jinými metodami UAE je rychlá technika, která je zvláště zajímavá, protože se zabránuje hydrolýze HCN (Rodríguez Madrera R & Suárez Valles B. 2021). Jednou z jejích výhod je možnost provádět extrakci několika vzorků současně v relativně krátké době. Je však nutné extrakt dekantovat nebo filtrovat přes

vhodné papírové filtry. Neprůhledný roztok po extrakci by se totiž mohl zachytit na koloně HPLC. (Arceusz et al. 2013).

Zrychlená metoda extrakce rozpouštědlem (ASE) je relativně nová technika vyvinutá a distribuovaná hlavně společností Dionex (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA). V literatuře existují alternativní názvy pro tuto techniku, jako je extrakce tlakovou tekutinou (PFE) a extrakce tlakovou kapalinou (PLE).

ASE je extrakční postup využívající organická rozpouštědla při vysokých teplotách (až 200 °C) a tlacích (přibližně 3,3 – 20,3 MPa) po kratší dobu (5 – 15 min.). Během těchto procesů se zvyšuje rozpustnost cílových sloučenin, zvyšuje se rychlost difúze rozpouštědla a přenos hmoty. Taky se snižuje viskozita rozpouštědla a povrchové napětí. Extrakční proces ASE má navíc tu výhodu, že potřebuje méně rozpouštědla, je automatizovaný a rychlý a může uchovat vzorek v prostředí bez kyslíku a světla (Liu et al. 2019).

Extrakce superkritickou tekutinou (SFE) často předchází analýze pomocí HPLC. Využití technologie superkritických tekutin (především CO₂) k extrakci bioaktivních látek z rostlinných zdrojů má velmi významný nárůst díky kvalitě a čistotě získaných extraktů a taky tomu, že se jedná o technologii, která neprodukuje toxický odpad. Proces se provádí při relativně nízkých teplotách, bez světla a kyslíku, což zabraňuje degradaci labilních sloučenin a také oxidačním reakcím. Jednou z nevýhod CO₂ je jeho nízká polarita (chová se jako lipofilní rozpouštědlo), což má za následek minimální extrakci polárních sloučenin, zejména fenolů, flavonoidů a terpenoidů. Pro zvýšení polarity a selektivity superkritického CO₂ bylo navrženo použití pomocných rozpouštědel (hlavně ethanolu kvůli jeho nízké toxicitě), aby se výrazně zlepšila extrakce těchto polárních sloučenin. Bylo však hlášeno, že některé fenolické a flavonoidní sloučeniny (gallová kyselina, protokatechuová kyselina, kávová kyselina, methylgalát, katechin, rutin, myrecitin, kvercetin, kaempferol) jsou ve skutečnosti rozpustné v superkritickém CO₂ při vysokých tlacích, hustota kapaliny se zvyšuje, protože tlak se zvyšuje při konstantní teplotě (Cid-Ortega et al. 2018).

Extrakce superkritickou tekutinou je moderní technika, která má oproti klasickým metodám extrakce mnoho výhod. Mezi ně patří nízké teploty, což je pozitivní rys v případě analýzy tepelně labilních sloučenin. Dalšími výhodami jsou vysoká selektivita, významné snížení objemu rozpouštědla použitého pro extrakci, nízká hmotnost vzorku pro extrakci (kolem několika mg), krátká doba extrakce, možnost automatizace, stejně jako off-line a on-line vazba s většinou chromatografické techniky (GC, HPLC) (Arceusz et al. 2013).

SFE se běžně používá ve farmaceutickém průmyslu i v potravinářských a kosmetických oborech. Extrakce superkritickou tekutinou slouží k izolaci biologicky aktivních sloučenin z rostlinných materiálů, zejména těch, které nelze oddělit pomocí jednoduché extrakce rozpouštědlem.

3.4.2 Metody stanovení amygdalinu metodou HPLC

Vysokoúčinná a ultravýkonná kapalinová chromatografie (HPLC, resp. UPLC) jsou běžné analytické metody pro detekci a identifikaci složek ve složitých směsích. Základem těchto technik je odběr vzorků a následná separace vzorku pomocí kolony s vhodnými vlastnostmi, což vede k tomu, že různé sloučeniny eluují z kolony v různých časech.

Princip HPLC je možné stručně popsát v následujících tvrzení (Aryal S. 2022):

- Čištění probíhá v separační koloně mezi stacionární a mobilní fází.
- Stacionární fáze je zrnitý materiál s velmi malými porézními částicemi v separační koloně.
- Mobilní fáze je na druhé straně rozpouštědlo nebo směs rozpouštědel, která se protlačuje za vysokého tlaku přes separační kolonu.
- Přes ventil s připojenou vzorkovací smyčkou, tj. malou trubičkou nebo kapilárou z nerezové oceli, je vzorek injekční stříkačkou vstříkovan do proudu mobilní fáze z čerpadla do separační kolony.
- Následně jednotlivé složky vzorku migrují kolonou různou rychlostí, protože jsou v různé míře zadržovány interakcemi se stacionární fází.
- Po opuštění kolony jsou jednotlivé látky detekovány vhodným detektorem a předány jako signál do HPLC softwaru v počítači.
- Na konci této operace se získá chromatogram v softwaru HPLC na počítači.
- Chromatogram umožňuje identifikaci a kvantifikaci různých látek.

HPLC s obrácenými fázemi (RP-HPLC) je jednou z nejrozšířenějších metod díky své rychlosti, stabilitě kolony a schopnosti oddělit širokou škálu sloučenin. V procesu existují dvě varianty HPLC, v závislosti na stacionárním fázovém systému. Tato metoda odděluje analyty na základě polarity. NP-HPLC používá polární stacionární fázi a nepolární mobilní fázi. Stacionární fáze je proto obvykle oxid křemičitý a typické mobilní fáze jsou hexan, methylenchlorid, chloroform, diethylether a jejich směsi. Polární látky jsou tedy zadrženy na polárním povrchu kolony a jejich retenční časy jsou delší než pro méně polární sloučeniny. V případě HPLC s reverzní fází je stacionární fáze nepolární (hydrofobní) povahy, zatímco mobilní fáze je polární kapalina, například voda, methanol, acetonitril nebo jejich směsi. HPLC s reverzní fází pracuje na principu hydrofobních interakcí, takže čím je látka více nepolární, tím déle bude na koloně zadržena. HPLC s obrácenými fázemi je zdaleka nejoblíbenější režimem v chromatografii. Téměř 90 % všech analýz vzorků s nízkou molekulovou hmotností se provádí pomocí RP-HPLC (Ravi Sankar et al. 2019).

Podle separačního mechanismu analyzovaných látek se HPLC dělí na adsorpční, distribuční, iontově výměnou, rozdělovací a výměnou chromatografii. Je třeba mít na paměti, že v praxi separace často neprobíhá jedním, ale několika mechanismy současně. Rozdělování je tedy komplikováno adsorpčními účinky, adsorpce distribucí a naopak. Kromě toho, čím větší je rozdíl v látkách ve vzorku podle stupně ionizace, zásaditosti nebo kyselosti, molekulové hmotnosti, polarizovatelnosti a dalších parametrů, tím větší je pravděpodobnost odlišného separačního mechanismu pro takové látky.

Mnoho vědců použilo HPLC metodu pro stanovení množství amygdalinu v různých rostlinných materiálech. Metoda HPLC byla validována podle linearitu, reprodukovatelnosti, limitu detekce a přesnosti. Linearita byla ověřena pomocí standardních roztoků D-amygdalinu. Identifikace sloučeniny byla založena na přesné hmotnosti, charakteristických fragmentačních drahách a retenčních časech (Shuya Xu et al. 2017). K provedení analýzy musí být vzorek správně extrahován z rostlinného materiálu.

4 Metodika

4.1 Použité chemikálie

- Ethanol – čistota 96 % (Lachner, Česká republika)
- Diethylether p.a. stabilizovaný (Lachner, Česká republika)
- Methanol p.a. (Lachner, Česká republika)
- Deionizovaná voda (Millipore, Francie)
- Redestilovaná voda (GFL, Německo)
- Standard: Amygdalin – čistota $\geq 97\%$, BioXtra (Sigma Aldrich)

4.2 Pomůcky

- Běžné laboratorní sklo
- Automatické pipety (100 – 1000 μ l) (Thermo Scientific, Česká republika)
- Injekční jednorázové stříkačky Luer-Slip (3 ml) (Fischer Scientific, Německo)
- Jednorázové plastové kyvety 45 ml, Plastibrand (GmbH, Německo)
- Pipety (Socorex Acura, Švýcarsko)
- Filtrační papír (VWR, Německo)
- Membránový filtr Nylon (13 mm, 0,2 μ m) (Agilent Technologies, Čína)
- PVDF mikrofiltry s porozitou 0,45 μ m (Chromservis, Česká republika)
- HPLC vialky (2 ml) (VT0098M-1232, Německo)

4.3 Přístroje

- Porcelánová miska třecí, 30 ml
- Mlýnek IKA A 11 basic Analytical mill (Janke & Kunkel Co., Staufen, Německo)
- Chromatografický systém HPLC, Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Rotační vakuová odparka BÜCHI Rotavapor (BÜCHI Laboraltechnik AG, Švýcarsko)
- Vodní lázeň (GFL, Německo)
- Přístroj na přípravu redestilované vody GFL 2104 (GFL, Německo)
- Centrifuga 5810R (Eppendorf, Německo)
- Filtrační přístroj pro demineralizaci vody značky Millipore, s vodní vývěvou (Francie)
- Lednice (R6139W, Gorenje, Slovinsko)
- Analytické váhy (Kern&Sohn GmbH, Německo)
- Váhy s přesností na 3 a 4 desetinná místa (Kern&Sohn GmbH, Německo)
- Třepačka VORTEX SA 7 (Stuart, Anglie)
- RVO IKA (HPST, s.r.o., Česká republika)

4.4 Experimentální materiál

Byla provedena analýza semen 14 odrůd jablek (z toho jsou 9 odrůd z jednoho zdroje, odrůda Golden Delicious ze dvou zdrojů, odrůda Šampion ze třech zdrojů), 2 odrůd hrušek a 1 odrůdy višně. Všechny vzorky byly analyzovány ve třech paralelních stanoveních.

Pro analýzu byly vybrány následující odrůdy ovoce (tab. 7).

Tab. 7 Odrůdy ovoce

Číslo	Název odrůdy	Název odrůdy v latině
1	Jabloň Topaz	<i>Malus domestica Topaz</i>
2	Jabloň Orion	<i>Malus domestica Orion</i>
3	Jabloň Luna	<i>Malus domestica Luna</i>
4	Jabloň Golden Delicious	<i>Malus domestica Golden Delicious</i>
5	Jabloň Cripps Pink	<i>Malus domestica Pink Lady</i>
6	Jabloň Jonaprince	<i>Malus domestica Red Jonaprince</i>
7	Jabloň Discovery	<i>Malus domestica Discovery</i>
8	Jabloň Red Delicious	<i>Malus domestica Red Delicious</i>
9	Jabloň Šampion	<i>Malus domestica Champion</i>
10	Jabloň Průsvitné letní	<i>Malus domestica White Transparent</i>
11	Jabloň Braeburn	<i>Malus domestica Braeburn</i>
12	Hruška Radana	<i>Pyrus communis Radana</i>
13	Hruška Williamsová máslovka	<i>Pyrus communis William's red</i>
14	Višněň Lutowka	<i>Prunus cerasus Lutowka</i>

Většina ovoce prochází z Česka, 1 odrůda jablek Průsvitné letní (*Malus domestica White Transparent*) prochází z Ruska.

Ze stejného počtu kusů jablek byl získán jiný počet semen. Jabloně odrůd Orion, Topaz, Luna, Red Delicious, Golden Delicious rostou v jednom produkčním sadu na experimentálním pozemku ČZU v Praze-Suchdole. Analýza půdy poskytla následující informace o její kvalitě:

- pH (CaCl₂) 7,6
- P – 230 mg.kg⁻¹
- K – 432 mg.kg⁻¹
- Ca – 8476 mg.kg⁻¹
- Mg – 215 mg.kg⁻¹
- S – 24,3 mg.kg⁻¹; Cu – 7,65 mg.kg⁻¹; Fe – 77,1 mg.kg⁻¹; Zn – 14,7 mg.kg⁻¹; Mn – 210 mg.kg⁻¹; Al – 374 mg.kg⁻¹.

Jinak je možné charakterizovat půdu na Suchdolu jako černozem.

Ostatní semena byla získána z různých farmářských pozemků v ČR (Český Raj, Šumava, Chelčice, čtvrť Kobylisy v Praze). Odrůda Golden Delicious byla analyzována dvakrát, jeden ze vzorků pocházel z pozemku ČZU a druhý představoval semena jablek této odrůdy koupených v obchodě „Albert“. Jablka odrůd Cripps Pink a Jonaprince byla zakoupena v obchodě „Billa“.

V rámci Českého Ráje je pestré zastoupení jednotlivými půdními typy. Na tomto relativně malém území je možné napočítat celkem 7 z 25 půdních typů popsanych v Tomáškově půdní mapě České republiky z roku 2003. Jsou to plochy výskytu kvádrových pískovců, jejich zvětralín na plošinách a strukturních terasách. Druhými jsou plochy výskytu drťových sprašových hlín, převážně odvápněných. Vznikly zde nejúrodnější půdy, především hnědozemě (Mašin 2010).

Což se týká půdy Šumavy, je možné říci, že v největším zastoupení je hnědá půda, typická na kyselých až neutrálních vyvěřelých a metamorfovaných horninách, středně hluboká až mělká, hlinitopísčité až písčitolhinitá se středním až malým přirozeným obsahem živin. Druhým nejrozšířenějším typem jsou hnědozemě, vyskytující se na spraších a částečně i na smíšených svahovinách z karbonátového materiálu. Jsou to velmi kvalitní půdy, mají zásoby a živiny na úrovni černozemí, lišící se však hlavně horšími fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Vývojově za hnědozeměmi následují illimerizované půdy vázané na těžké smíšené svahoviny, kyselá až neutrální intruziva a metamorfované horniny, překrývající smíšené svahoviny. Hlavně podél místních vodotečí zaujímá nivní půda typická, která vznikla na bezkarbonátových nivních uloženinách, pak hnědá půda illimerizovaná na kyselých až neutrálních intruzivách a metamorfovaných horninách a drnoglejová půda na aluviálních až deluviálních uloženinách (Onderka 2007).

Půda v Jihočeském kraji je méně úrodná, jsou zde převážně hnědé půdy a podzoly. Druh půdy je převážně hlinito-písčité. Ale pěstování ovoce ve specifické Chelčicko-Lhenické oblasti má bohatou tradici a je chráněným zeměpisným označením Evropské unie, jehož účelem je zachovat dobré jméno a kvalitu ovoce vyráběného na území Chelčicko-Lhenické pěstitelské oblasti a ochránit je před nekalou konkurencí. Sady se rozprostírají v Bavorovské kotlině, což je Chelčicko a v podhůří Blanského lesa Lhenicko. Chelčicko-Lhenické ovoce se pěstuje pouze v této oblasti (Česká republika, Jihočeský kraj, okresy Strakonice a Prachatice). Obce Chelčice patří k této oblasti.

Půdní poměry Prahy a jejího okolí jsou značně pestré. Dominujícím půdním typem této oblasti jsou černozemě, vytvořené na spraších, případně karbonátových hlínách s vysokým podílem eolického materiálu, vzácněji na slínovcích. Absolutně nejkvalitnější půdy jsou v severovýchodní oblasti (k. ú. Ďáblice, Březiněves, Třeboradice, Vinoř, Satalice), kde se jedná o černozemě na spraši, středně těžké, s příznivým vodním režimem (Český hydrometeorologický ústav). Kobylisy se taky nachází na severovýchodě Prahy.

4.4.1 Příprava vzorku

Semena byla rozdrčena v mlýnku a třecí misce. 0,2 g takto zpracovaných semen bylo naváženo do 100 ml varné baňky. Pak bylo přidáno 50 ml ethanolu a směs byla extrahována ve vodní lázni pod zpětným chladičem 100 minut při teplotě bodu varu ethanolu 78,6 °C za občasného míchání.

Po vychladnutí byl obsah baňky přefiltrován přes Whatmanův filtr č.1 a do sucha odpařen na rotační vakuové odparce (35 °C, 7 mbar, nízká frekvence otáček). K suchému vzorku bylo přidáno 10 ml diethyletheru a směs byla vortexována 1 minutu při pokojové teplotě, tím došlo k odtučnění vzorku. Zbytek po extrakci s obsahujícím amygdalinem byl ponechán v digestoři k odpaření diethyletheru přes noc. Sraženina amygdalinu byla

rozpouštěna v 5 ml deionizované vody. Alikvotní část byla převedena do centrifugačních zkumavek a odstředěna 10 minut při pokojové teplotě při 16000 otáčkách). Supernatant byl přefiltrován přes membránový mikrofiltr PTFE, 0,45 μm a použit k nástřiku pro chromatografii. Stanovení bylo provedeno 3x z každého vzorku.

4.4.2 HPLC stanovení

HPLC stanovení bylo prováděné na přístroji WATERS. K separaci byla použita kolona C18 (150 x 4,6 mm, 3 μm). Mobilní fáze se skládala z methanolu a vody v poměru 25 : 75 (izokratická eluce). Průtok mobilní fáze byl 0,6 ml.min⁻¹. Nástřik extraktu činil 10 μl . detekční vlnová délka na detektoru PDA byla nastavena na 215 nm (maximum absorpce záření). Teplota kolony byla 30 °C. Kalibrace byla připravena v rozsahu 1 – 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$.

5 Výsledky

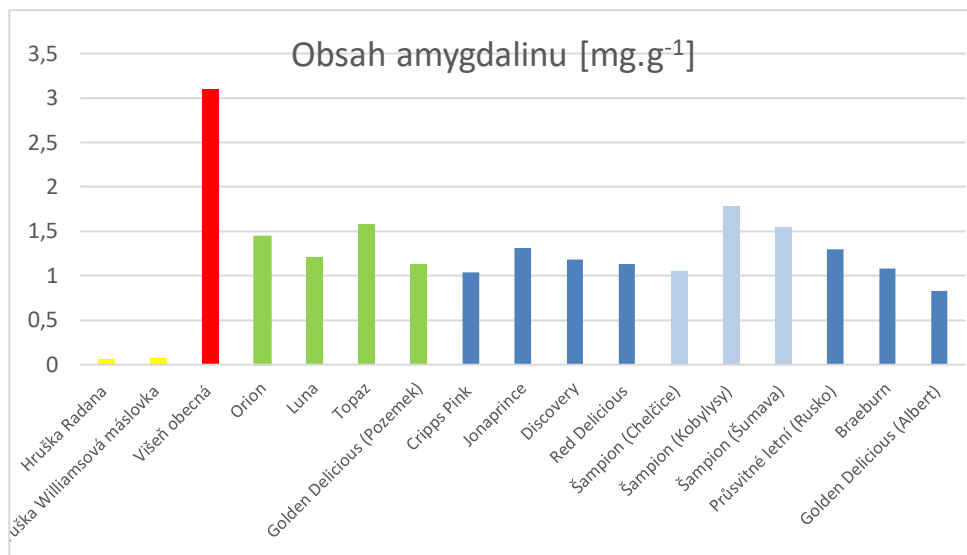
Obsah amygdalinu v analyzovaných semenech ovoce je uveden v tabulce 8.

Tab. 8 Obsah amygdalinu v semenech ovoce

Odrůda	Lokalita/místo nákupu	Obsah amygdalinu průměr [mg.g ⁻¹]	Směrodatná odchylka [mg.g ⁻¹]
Hruška Radana	Český Raj	0,06	0,00
Hruška Williamssová máslovka	Český Raj	0,07	0,00
Višeň Lutowka	Chelčice	3,10	0,06
Orion	Pozemek ČZU	1,44	0,00
Luna	Pozemek ČZU	1,21	0,04
Topaz	Pozemek ČZU	1,58	0,01
Golden Delicious	Pozemek ČZU	1,13	0,06
Cripps Pink	Billa	1,04	0,03
Jonaprince	Billa	1,31	0,06
Braeburn	Billa	1,08	0,05
Discovery	Český Raj	1,18	0,02
Red Delicious	Albert	1,13	0,06
Golden Delicious	Albert	0,83	0,05
Šampion	Chelčice	1,05	0,01
Šampion	Kobylišy	1,78	0,00
Šampion	Šumava	1,55	0,04
Průsvitné letní	Rusko	1,30	0,01

Nejvíce amygdalinu obsahovala semena višně 3,10 mg.g⁻¹. Nejméně amygdalinu obsahovala semena hrušek v rozmezí 0,06 – 0,07 mg.g⁻¹. Množství amygdalinu se v semenech jablek liší. Navíc, jak je vidět na obrázku 6, vztah mezi množstvím amygdalinu v jablkách stejné odrůdy nebyl odhalen (světle modré sloupce). Lze předpokládat, že množství amygdalinu v semenech plodů je výsledkem kombinace různých faktorů, včetně nejen odrůdy, ale také typu půdy, na které bylo ovoce pěstováno, počasí, stupně zralosti plodů atd. včetně vlivu biogenních stresorů (škůdci, choroby).

Na obrázku 6 jsou zelenou barvou označena jablka různých odrůd pěstovaných na stejném pozemku. Sloupec světle modré barvy označuje jablka stejné odrůdy, ale pěstovaná na různých podzemích. Je vidět, že rozdíl mezi jednotlivými vzorky se liší více v druhém případě. Směrodatná odchylka vzorků jedné odrůdy je 0,373 a směrodatná odchylka jablek různých odrůd pěstovaných na stejném pozemku je 0,207. Z toho lze usoudit, že odrůda má menší vliv na množství amygdalinu v semenech jablek než vliv pozemku, kde ovoce bylo pěstováno.



Obrázek 6. Obsah amygdalinu v peckovém ovoce

Nejvíce amygdalinu obsahovala jablka odrůdy Šampion pěstovaných v Kobylisích (Praha) $1,78 \text{ mg.g}^{-1}$. Nejméně amygdalinu obsahovala semena jablek odrůdy Golden Delicious nakoupených v obchodu Albert $0,83 \text{ mg.g}^{-1}$.

6 Diskuze

Haque (2002) stanovil obsah amygdalinu v jablkách odrůdy Fuji v množství $5,4 \text{ mg.g}^{-1}$. Bolarinwa et al. (2015) uvádí údaje o množství amygdalinu v semenech jablek 15 odrůd. Semena Golden Delicious měla nejvyšší obsah amygdalinu ($3,9 \text{ mg.g}^{-1}$) následovala semena odrůd Royal Gala (3 mg.g^{-1}), Red Delicious ($2,8 \text{ mg.g}^{-1}$), Spartan ($2,6 \text{ mg.g}^{-1}$) a Pink Lady ($2,6 \text{ mg.g}^{-1}$). Obsah amygdalinu v semenech jablek Rubens, Elstar, Empire a Jazz byl 2,4; 2,4; 2,3 respektive $2,2 \text{ mg.g}^{-1}$. Nižší obsah amygdalinu byl stanoven v odrůdách Fuji ($1,9 \text{ mg.g}^{-1}$), Coxu ($1,6 \text{ mg.g}^{-1}$), Granny Smith ($1,6 \text{ mg.g}^{-1}$), Bramley ($1,3 \text{ mg.g}^{-1}$) a Braeburn ($1,2 \text{ mg.g}^{-1}$). Nejnižší obsah amygdalinu ukazovala odrůda Russet 1 mg.g^{-1} .

V nedávné studii zabývající se stanovením amygdalinu v semenech jablek odrůdy Golden Delicious (Mikulic-Petkovsek et al. 2019) byly získány nižší hodnoty obsahu amygdalinu oproti údajům uvedeným na začátku diskuze. V tomto článku byla analyzována jablka stejné odrůdy Golden Delicious, ale pěstovaná za odlišných podmínek, v různých zemích. Množství amygdalinu v semenech jablek z Ázerbájdžánu bylo $1,1 \text{ mg.g}^{-1}$, v semenech jablek z Ruska $0,68 \text{ mg.g}^{-1}$, v semenech jablek ze Srbska $0,75 \text{ mg.g}^{-1}$, v semenech jablek ze Slovinska $0,73 \text{ mg.g}^{-1}$.

V našem pokusu byla též zkoušená odrůda Golden Delicious. Semena jablek z pozemku ČZU obsahovala $1,13 \text{ mg.g}^{-1}$ amygdalinu, semena jablek zakoupených v obchodě Albert obsahovala $0,83 \text{ mg.g}^{-1}$ amygdalinu. Na základě obdržných výsledků se dá konstatovat, že semena jablek z pozemku ČZU obsahem amygdalinu jsou nejbližší semenům jablek z Ázerbájdžánu. Ale semena jablek zakoupených v obchodě Albert obsahem amygdalinu jsou nejbližší semenům jablek ze Srbska a Slovinska. Uvedená data tak ale úplně nekorespondují s výsledkem Bolarinwa et al. (2015), kde amygdalinu v semenech jablek odrůdy Golden Delicious byl stanoven $3,9 \text{ mg.g}^{-1}$.

Mikulic-Petkovsek et al. (2019) popisují, že rostliny syntetizují kyanogenní glykosidy a ukládají je do semen v případě nepříznivých okolních podmínek. V dříve publikované studii je uvedeno, že obsah kyanogenních glykosidů byl vyšší v suchých rostlinách než v dobře zavlažovaných rostlinách.

Jak je vidět z porovnání obsahu amygdalinu, je vyšší v semenech jablek, která analyzoval Bolarinwa et al. (2015). Lze předpokládat, že relativně vysoký obsah amygdalinu kromě jiného může být vyvolán faktory nepříznivého počasí, o kterých data nejsou. Avšak vzhledem k tomu, že se studie nezabývaly celou řadou dalších faktorů ovlivňujících množství amygdalinu v rostlinách, nelze to s jistotou tvrdit. Je možné předpokládat, že jablka, ze kterých byla semena získána za účelem zkoumání, nebyla ve stejném stupni zralosti, což by jistě též mohlo ovlivnit výsledky. Je také pravděpodobné, že metabolické procesy v jablkách různých odrůd probíhají s menšími odchylkami. To vyplývá z odlišností chuťových a obecně senzorických vlastností jednotlivých odrůd a také to znamená, že tvorba stejných látek, které rostlinná hmota jablek obsahuje, jako jsou cukry a kyseliny, probíhá jinak. Lze říci totéž o kyanogenních glykosidech. Jistě stojí za zmínku, že chuťové a senzorické vlastnosti jsou ovlivněny stupněm zralosti. Z výsledků této diplomové práce vyplývá, že odrůda má menší vliv na obsah amygdalinu než lokalita. I když nebyly sledovány veškeré podmínky pěstování, je možné předpokládat, že podmínky mají velký vliv na obsah amygdalinu. Výsledky v podstatě korespondují s literárními daty jiných autorů.

Mikulic-Petkovsek et al. (2019) tvrdějí, že půda může být důvodem vyššího obsahu kyanogenních glykosidů v semenech jablek. Město Xudat v Ázerbájdžánu, odkud prochází jablka s nejvyšším obsahem amygdalinu, leží v blízkosti Kaspického moře a půda v sadu měla vyšší obsah soli. Bylo prokázáno, že obsah kyanogenních glykosidů se zvyšuje v rostlinách s vysokou zasoleností půdy, v listech se syntetizují kyanogenní glykosidy a poté se transportují do jiných částí rostlin. Zhao (2012) také uvedl, že během vývoje ovoce se některé kyanogenní glykosidy syntetizují v buněčném tegumentu a následně se transportují do semenného kotyledonu.

Půda ze sadu ČZU, kde byla pěstována jablka odrůd Topaz, Orion, Luna, Golden Delicious pro náš výzkum, byla odebrána pro agrochemickou analýzu. Výsledek ukázal, že má pH 7,5, což tuto půdu lze považovat za mírně zásaditou. Alkalické půdy mají zpravidla vysoký obsah vápenatých solí, pročež tento faktor může také ovlivnit množství amygdalinu v semenech jablek. Z našich výsledků je patrné, že nejvíce amygdalinu bylo zjištěno v semenech jablek odrůdy Šampion pěstovaných v Praze. Vzhledem k tomu, že půda ve velkých městech je obvykle zasolená, podmínky jsou agresivnější a syntéza amygdalinu se za nepříznivých podmínek zvyšuje. Proto je logické, že semena těchto jablek měla nejvíce amygdalinu. Za zmínku také stojí, že tato jablka byla sbírána k přímé konzumaci, tedy v nejvyšší fázi zralosti plodů. Bylo by tedy zajímavé sledovat, jak složení půdy a stupeň zralosti plodů ovlivňuje tvorbu kyanogenních glykosidů v rostlinách.

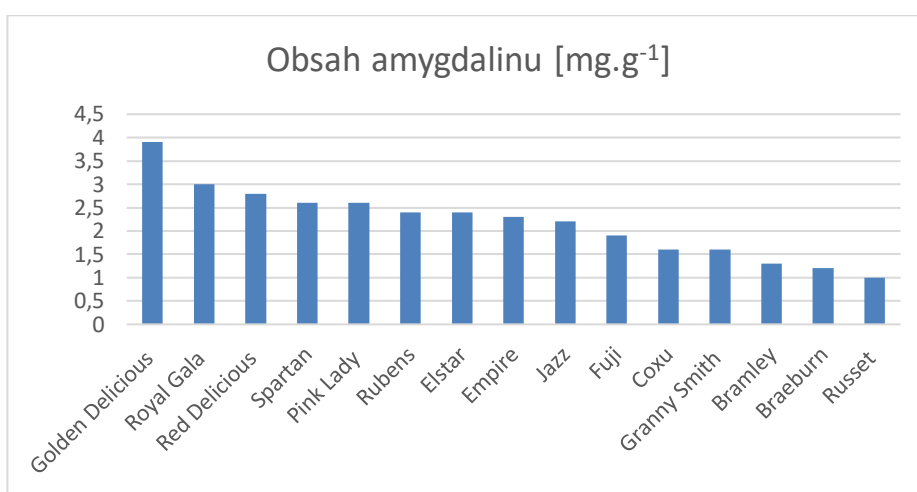
Kyanogenní glykosidy s fenolovými látkami dohromady hrají také důležitou roli jako účinná ochrana před býložravci a mohou představovat významný odliv zdrojů, které by jinak mohly být použity pro růst (Mikulic-Petkovsek et al. 2019). Údaje o počtu škůdců v ovocném sadu nejsou přesně známé. Lze ale odhadnout, že na pozemku ČZU, kde byla jablka odebrána pro výzkum, byla včas přijata nezbytná opatření na ochranu před škůdci, a to instalace zvláštního oplocení na kmeny stromů pro ochranu kůry před hlodavci, sběr infikovaných a poškozených jablek z větví a ze země pod jabloněmi. V sezóně odstranění poškozeného ovoce se provádí každý týden. V důsledku toho lze předpokládat, že v semenech amygdalinu se netvořilo víc, než je potřeba pro minimální ochranu proti škůdcům.

Teplota, kyslík a oxid uhličitý jsou důležité pro intenzitu dýchání během skladování. Čím vyšší je rychlost dýchání, tím vyšší je koncentrace CO₂. Skupinou vědců byla studována semena jablek, která byla skladována v typických podmínkách ovocných skladů po dobu 100, 180 a 240 dní po sklizni. Mikulic-Petkovsek et al. (2019) uvádí, že po 180 dnech skladování v řízené atmosféře obsah kyanogenních glykosidů v semenech jablek se snížil. Ale během období aktivního dýchání, tj. po sklizni ovoce a jeho skladování po dobu šesti měsíců, bylo možné pozorovat nárůst počtu kyanogenních glykosidů v semenech jablek.

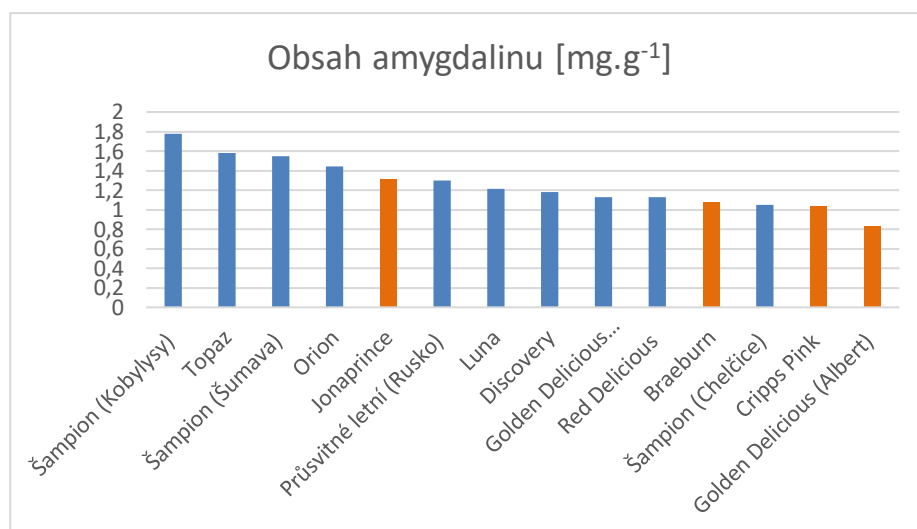
Pro diplomovou studii byla použita dozralá jablka odrůd Topaz, Orion, Luna, Golden Delicious sebraných na pozemku ČZU. Všechny plody byly sbírány přímo ze stromů, ne spadané z půdy. Výsledky výzkumného šetření odpovídají existujícím datům o obsahu amygdalinu v semenech jablek po sklizni. Dobu skladování ostatních jablek lze jen předpokládat, přesná data nejsou k dispozici.

Hrušky použité ve studii byly zakoupeny na farmářských trzích v Praze. Existuje několik fází zralosti hrušek: technická, botanická, konzumní a úplná fyziologická. Evropské odrůdy hrušek nemají dostatečnou schopnost dozrávat ihned po sklizni, musí být vystaveny chladové teplotě nebo ošetřeny etylenem. Použité hrušky byly v botanické fázi zrání (bylo vidět

korkovou vrstvou mezi výhonem a stopkou, plody se snadno oddělovaly od větví) a nebyly žádným způsobem ošetřeny. Semena hrušky Radany měly menší objem a množství experimentálního materiálu na rozdíl od Williamsově máslovky. Nicméně podle analýzy semena odrůd mají skoro stejné množství amygdalinu. V literatuře se uvádí množství amygdalinu v semenech jablek a hrušek v rozmezí 1 – 4 mg.g⁻¹, ale takže se uvádí, že v hruškách je amygdalinu méně (Bolarinwa et al. 2015). Lze tvrdit, že stanovené množství 0,06 mg.g⁻¹ pro hrušku Radana a 0,07 mg.g⁻¹ pro hrušku Williamsová máslovka je nižší, ale ne zásadně odlišné. V existujících studiích většina autorů analyzuje odrůdu Konference (*Pyrus communis Conference*), je možné, že tato odrůda obsahuje amygdalinu více než odrůda Radana a Williamsová máslovka.



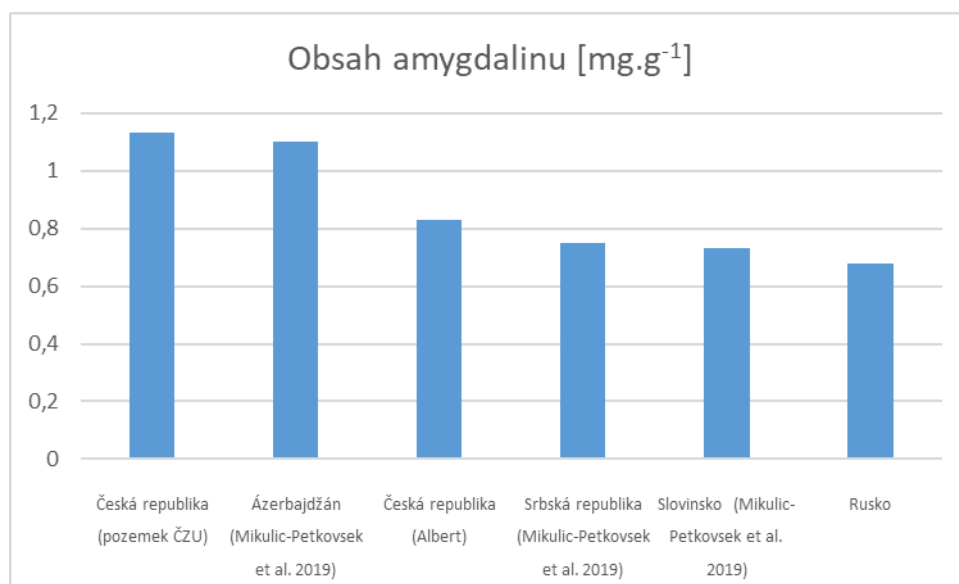
Obrázek 7. Obsah amygdalinu podle odrůd jablek dle Bolarinwa et al. (2015)



Obrázek 8. Obsah amygdalinu podle odrůd jablek zakoupených a sebraných v ČR

Rozdíly tak velké nejsou a mohou být vysvětleny dobou zrání, fází zrání, kdy byla jablka sebrána, klimatickými podmínkami a dalšími faktory. Třeba stejná odrůda Braeburn podle studie Bolarinwa et al. (2015) obsahuje 1,2 mg.g⁻¹ amygdalinu v semenech. Při analýze semen jablek pro danou diplomovou práci bylo zjištěno 1,08 mg.g⁻¹ amygdalinu. Uvedená data jsou podobná.

Ve studii zabývající se stanovením amygdalinu v semenech jablek odrůdy Golden Delicious (Mikulic-Petkovsek et al. 2019) byly určeny nižší hodnoty amygdalinu než ve studii Bolarinwa et al. (2015), ale v porovnání s výsledky výzkumného šetření pro danou diplomovou práci tyto hodnoty jsou podobné.



Obrázek 9. Obsah amygdalinu v jablekách odrůdy Golden Delicious různého původu (Mikulic-Petkovsek et al. 2019, Fadeeva 2022)

Při sběru rostlinného materiálu se předpokládalo, že v semenech jablek zakoupených v obchodech bude méně amygdalinu, protože jablka určená k dlouhodobé distribuci se zpravidla sklízí v takové fázi zrání, že jablka dozrávají ve skladu. Tento předpoklad se však nepotvrdil (oranžové sloupce na obrázku 7).

Nejméně amygdalinu obsahují jablka Golden Delicious zakoupená v prodejně Albert. Z těchto údajů vyplývá, že nezralá jablka obsahují méně amygdalinu. Ve studii Deng et al. (2021) uvádí, že amygdalin se akumuloval v pozdějších fázích zralosti hořkého jádra meruňky. Vzorec akumulace kyanogenních glykosidů v hořkých jádrech naznačoval posun od stavu s převahou prunasinu do stavu s převahou amygdalinu během vývoje a zrání jádra. Meruňky patří do stejné čeledi rostlin růžovité (*Rosaceae*) jako jablka, což naznačuje podobnost procesů syntézy a akumulace sekundárních metabolitů.

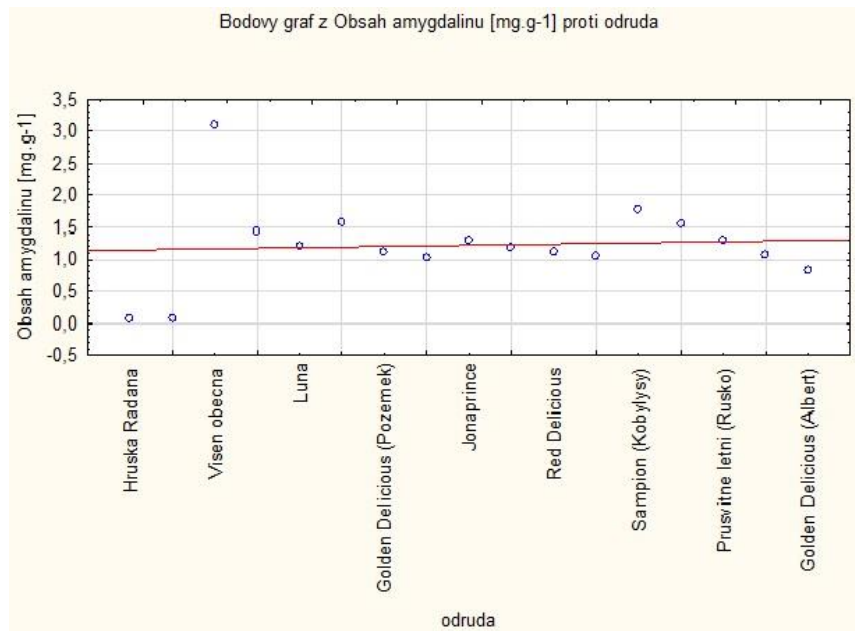
Biosyntéza a akumulace sekundárních metabolitů v ovoci jsou též ovlivňovány geografickým prostředím, druhem, vývojovými stádii, půdou, klimatem, kultivačním systémem, agronomickým managementem, dobou sklizně a úrovní zralosti (Deng et al. 2021).

Wang (Wang et al. 2022) předpokládá, že jedinečné geografické prostředí (zeměpisná délka a šířka, nadmořská výška, sklon a odpovídající klimatické změny) a genomové rozdíly by mohly značně ovlivnit biosyntézu a akumulaci amygdalinu. Faktorová analýza ukázala, že obsah amygdalinu v jádrech *Prunus spp.* se zvyšoval s nadmořskou výškou, klesal s klesající nadmořskou výškou a měl menší vztah k zeměpisné délce, zeměpisné šířce a sklonu.

Rozmanitost existujících odrůd jablek a jejich odlišnosti jsou způsobeny agroklimatickými oblastmi a zónami, pěstitelskými postupy, nutričním složením a senzorickými vlastnostmi. Například odrůda Red Delicious má tmavší karmínově červený

povrch se stopami žluté a oranžové barvy. Fyzikální vlastnosti jablka Red Delicious jsou podlouhlé formy s hustou slupkou, vnitřní hmota je zrnitá a jemná s tající strukturou, obvykle vykazující malé, ale zjevné hrbolky na povrchu kůže (Li et al. 2021). Zatímco různé odrůdy vykazují různý vzhled, chuť a tvary, jablka mají jednu společnou vlastnost, kterou je schopnost shromáždění amygdalinu v semenech.

Většina odrůd podle obsahu amygdalinu se nachází v rozmezí 1,08 – 1,31 mg.g⁻¹.



Obrázek 10. Bodový graf obsahu amygdalinu v semenech jablek

Z výše uvedeného lze usoudit, že odrůda jablek není hlavním faktorem určujícím množství amygdalinu v semenech. Větší význam mají pěstitelské podmínky a fáze zralosti plodů a taky takové těžko pozorovatelné faktory, jako je počet hmyzích škůdců. Tohle je určité má vliv na množství amygdalinu, protože jedním z účelů amygdalinu jako sekundárního metabolitu v rostlinách je odpuzování hmyzů. Porovnáním množství amygdalinu v semenech jablek a v semenech hrušek je vidět, že semena jablek obsahují více amygdalinu. Ale ve srovnání s množstvím amygdalinu v semenech višni obsahují jablka této látky méně. Za zmínku také stojí, že semena višni jsou větší, takže k získání amygdalinu je potřeba méně rostlinného materiálu, což může mít vliv na použití vedlejších produktů ovocnářství.

7 Závěr

V diplomové práci byly stanovovány obsahy amygdalinu v semenech jablek, višňi a hrušňi pomocí HPLC techniky. Na základě získaných dat lze vyvodit následné závěry:

- Amygdalin patří mezi glykosidy, které patří k nejčastěji se vyskytujícím mezi sekundárním rostlinným metabolitům. V ČR je amygdalin nejvýznamnějším kyanogenním glykosidem. Amygdalin se nachází v rostlinách čeledi růžovitých (*Rosaceae*).
- Amygdalin má obecné vlastnosti glykosidů i vlastnosti specifické, což se odráží v procesu izolace látky z rostlinné hmoty a její analýze. HPLC je vhodnou metodou pro určení amygdalinu v semenech peckového ovoce.
- Většina odrůd podle obsahu amygdalinu se nachází v rozmezí 1,08 – 1,31 mg.g⁻¹. Nejvíce amygdalinu obsahovala jablka odrůdy Šampion pěstovaných v Kobylisích (Praha) 1,78 mg.g⁻¹. Nejméně amygdalinu obsahovala semena jablek odrůdy Golden Delicious nakoupených v obchodu Albert 0,83 mg.g⁻¹. Odrůda u jablek nehraje velkou roli v množství amygdalinu obsaženého v semenech. Větší význam mají pěstitelské podmínky, typ půdy, počasí a stupeň zralosti plodů.
- Na hypotézu, zda je amygdalin ohrožením nebo potenciálním zdrojem zlepšení zdraví člověka, konkrétně, jestli má amygdalin protirakovinové vlastnosti, v tuto chvíli není možné dát jednoznačnou odpověď. Analýza dostupné odborné literatury uvádí, že existují přinejmenším 2 teorie, které si navzájem odporují, a každá disponuje svou vlastní argumentací. Proto nelze jednoznačně hypotézu potvrdit, či vyloučit.
 - Amygdalin neohrožuje vedlejší produkty ovocnářství (výlisky semen), protože se vyskytuje v relativně nízkých koncentracích a zároveň je odbouráván při mechanickém a tepelném zpracování ovoce.

Cílů práce tak bylo dosaženo analýzou odborné literatury a stanovením amygdalinu v semenech pomocí HPLC. Hypotézy předložené na začátku práce nebyly plně potvrzeny, což znamená, že množství amygdalinu v peckovém ovoce je zajímavé pro další výzkum. Však neexistuje žádné nebezpečí, že by spotřebitelé po konzumaci přiměřeného počtu semen jablek a hrušek pocítovali toxické účinky kyanogenních glykosidů.

8 Literatura

- Abboud MM, Al Awaida W, Alkhateeb HH, Abu-ayyad AN. 2018. Antitumor action of amygdalin on human breast cancer cells by selective sensitization to oxidative stress. *Nutrition and Cancer* **71**: 1-8.
- Abe I. 2007. Enzymatic synthesis of cyclic triterpenes. *Natural Product Reports* **24**: 1311-1331.
- Alfarouk KO, Muddathir AK, Shayoub ME. 2011. Tumor acidity as evolutionary spite. *Cancers (Basel)* **3**: 408-414.
- Arceusz A, Wesolowski M, Konieczynski P. 2013. Methods for extraction and determination of phenolic acids in medicinal plants: a review. *Natural Product Communications* **8**. DOI: doi.org/10.1177/1934578X1300801238.
- Arikan EB, Canli O, Caro Y, Dufossé L, Dizge N. 2020. Production of bio-based pigments from food processing industry by-products (Apple, Pomegranate, Black Carrot, Red Beet Pulps) using *aspergillus carbonarius*. *Journal of Fungi*. DOI: 10.3390/jof6040240.
- Aryal S. 2022. HPLC – definition, principle, parts, types, uses, diagram. Available from <https://microbenotes.com/high-performance-liquid-chromatography-hplc/> (accessed April 2022)
- Augustin JM, Kuzina V, Andersen SB, Bak S. 2011. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry* **72**: 435-457.
- Bandman AL, Ivin BA, Filov VA. 1988. Škodlivé chemikálie, anorganické sloučeniny prvků I – IV skupiny. Chemie, Moskva.
- Bauer K. 1953. Analýza organických sloučenin. Nakladatelství zahraniční literatury, Petrohrad.
- Biaglow JE., Durand RE. 1978. The enhanced radiation response of an in Vitro tumour model by cyanide released from hydrolysed amygdalin. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine* **33**: 397-401.
- Bolarinwa IF, Oke MO, Olaniyan SA, Ajala AS. 2016. A review of cyanogenic glycosides in edible plants. DOI: 10.5772/64886.
- Bolarinwa IF, Orfila C, Morgan MRA. 2015. Determination of amygdalin in apple seeds, fresh apples and processed apple juices. *Food Chemistry* **170**: 437 – 442.
- Borisova GG. 2014. Základy biochemie sekundárního metabolismu rostlin. Nakladatelství Uralské státní univerzity, Jekatěrinburg.

- Bromley J, Hughes B, Leong D, Buckley N. 2005. Life threatening interaction between complementary medicines: cyanide toxicity following ingestion of amygdalin and vitamin C. *Annals of Pharmacotherapy* **39**: 1566-1569.
- Buchancová J. 2003. *Pracovní lékařstvo a toxikologia*. Osveta, Martin.
- Buchtová I. 2018. *Odbor rostlinných komodit*. Mze, Praha.
- Cardiac glycoside downregulates NHE3 activity and expression in LLC-PK1 cells. *American journal of physiology* **290**: 997-1008.
- Cecarini V, Selmi S, Cuccioloni M. 2022. Targeting proteolysis with cyanogenic glycoside amygdalin induces apoptosis in breast cancer cells. *Molecules* **27**. DOI: 10.3390/molecules27217591.
- Cid-Ortega S, Monroy-Rivera JA. 2018. Extraction of kaempferol and its glycosides using supercritical fluids from plant sources: a review. *Food Technology and Biotechnology*. DOI: 10.17113/ftb.56.04.18.5870.
- Corradi C, Micheli G. 1982. Total hydrocyanic acid content of macaroons. *Industry Alimentary* **21**: 459-466.
- Cragg GM, Newman DJ. 2013. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta*. DOI: 10.1016/j.bbagen.2013.02.008.
- Danihelka J, Šmarda P. 2001. *Triglochin maritima* na slanisku u Nesytu. *Zprávy České botanické společnosti* **36**: 45-47.
- Del Cuetoa J, Møllerb BL, Dicentaa F, Sánchez-Pérez R. 2018. β -Glucosidase activity in almond seeds. *Plant Physiology and Biochemistry* **126**: 163–172.
- Deng P, Cui B, Zhu H, Phommakoun B, Zhang D, Li Y, Zhao F, Zhao Z. 2021. Accumulation pattern of amygdalin and prunasin and its correlation with fruit and kernel agronomic characteristics during Apricot (*Prunus armeniaca* L.) Kernel Development. *Foods*. DOI: org/10.3390/foods10020397.
- Dong-Sil P, Coats JR. 2002. Cyanogenic glycosides: alternative insecticides? *The Korean journal of pesticide science* **6**: 51-57.
- El-Ela FIA, Gamal A, Elbanna HA, ElBanna AH, Salem HF, Tulbah AS. 2022. *In Vitro* and *In Vivo* evaluation of the effectiveness and safety of amygdalin as a cancer therapy. *Pharmaceuticals (Basel)*. DOI: 10.3390/ph15111306.

- Enfissi EM, Barneche F, Ahmed I, Lichtlé C, Gerrish C, McQuinn RP, Giovannoni JJ, Lopez-Juez E, Bowler C, Bramley PM, Fraser PD. 2010. Integrative transcript and metabolite analysis of nutritionally enhanced DE-ETIOLATED1 downregulated tomato fruit. *Plant Cell*. DOI: 10.1105/tpc.110.073866.
- Estévez JM, Cantero A, Reindl A, Reichler S, León P, Boronat A. 2001. Analysis of the expression of CLA1, a gene that encodes the 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **126** (2): 843-856.
- Fadeeva N. 2000. Technologie extrakce biomasy *Padus avium mill* [PhD. Thesis]. Sibiřská státní technologická univerzita, Krasnojarsk.
- FAO. 2019. The State of Food and Agriculture 2019. Moving forward on food loss and waste reduction Rome.
- Ferreira VLP, Yotsuyanagi K, Carvalho CRL. 1995. Elimination of cyanogenic compounds from bamboo shoots *Dendrocalamus giganteus Munro*. *Tropical Science* **35**: 342-346.
- Fierascu RC, Sieniawska E, Ortan A, Fierascu I, Xiao J. 2020. Fruits by-products - a source of valuable active principles. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00319
- Franks TK, Yadollahi A, Wirthensohn MG, Guerin J, Kaiser BN, Sedgley M, Ford CM. 2008. A seed coat cyanohydrin glucosyltransferase is associated with bitterness in almond (*Prunus dulcis*) kernels. *Plant Physiology and Biochemistry* **35**: 236-246.
- Fromm M, Bayha S, Carle R, Kammerer DR. 2012. Comparison of fatty acid profiles and contents of seed oils recovered from dessert and cider apples and further Rosaceous plants. *European Food Research and Technology* **234**: 1033-1041
- Garcia-Salas P, Morales-Soto A, Segura-Carretero A, Fernandez-Gutierrez A. 2010. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules* **15**: 8813-8826.
- Górnas P, Rudzinska M, Segliņa D. 2014. Lipophilic composition of eleven apple seed oils: a promising source of unconventional oil from industry by-products. *Industrial Crops and Products* **60**: 86-91
- Gusynin IA. 1962. Toxikologie jedovatých rostlin. Nakladatelství zemědělské literatury, časopisů a plakátů, Moskva. Available from <http://www.cnsbh.ru/AKDiL/0045/base/k031.shtm> (accessed November 2018).
- Haque MR, Bradbury JH. 2002. Total cyanide determination of plants and foods using the picrate and acid hydrolysis methods. *Food Chemistry* **77**: 107-114.

- Harborne AJ. 1998. *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*. St. Edmundsbury Press, Bury St. Edmunds, Suffolk.
- Harborne JB. & Williams CA. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **55**. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)00235-1.
- Chen YU, Ma J, Wang F. 2013. Amygdalin induces apoptosis in human cervical cancer cell line HeLa cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **35**: 43-51.
- Cho HJ, Do BK, Shim SM, Kwon H, Lee DH, Nah AH, Choi YJ, Lee SY. 2013. Determination of cyanogenic compounds in edible plants by ion chromatography. *Toxicological Research*. DOI: 10.5487/TR.2013.29.2.143.
- James A. 2002. *CRC Handbook of Medicinal Spices*. CRC Press, Boca Raton.
- Kagan IA. 2011. Effects of pH, sample size, and solvent partitioning on recovery of soluble phenolic acids and isoflavonoids in leaves and stems of red clover (*Trifolium pratense* cv. *Kenland*). *Natural Product Communications* **6**: 1657-1660.
- Karpuk VV. 2011. *Farmakognosy*. Běloruská státní univerzita, Minsk.
- Kazazi H, Rezaei K. 2009. Effect of various parameters on the selective extraction of main components from Hyssop using supercritical fluid extraction (SFE). *Food Science and Technology Research* **15**: 645-652.
- Khaletsky AM. 1966. *Farmaceutická chemie*. Medicína, Moskva.
- Krakowska-Sieprawska A, Kiełbasa A, Rafińska K, Ligor M, Buszewski B. 2022. Modern Methods of Pre-Treatment of Plant Material for the Extraction of Bioactive Compounds. *Molecules*. DOI: 10.3390/molecules27030730
- Kramarenko VF. 2012. *Toxikologická chemie*. Kniha na vyžádání, Moskva.
- Kysilka J. 2001. *Přírodní látky*. Chlumeck nad Cidlinou. Available from https://cs.wikibooks.org/wiki/Chemie_přírodních_látek/Přehled_přírodních_látek/Glykosidy (accessed November 2019).
- Larramendy M, Soloneski S, editors. *Toxicology – new aspects to this scientific conundrum*. InTechOpen, London. Available from <https://www.intechopen.com/books/toxicology-new-aspects-to-this-scientific-conundrum> (accessed January 2020).
- Lau KQ, Sabran MR, Shafie SR. 2021. Utilization of vegetable and fruit by-products as functional ingredient and food. *Frontiers in Nutrition* **8**: 661-693.

- Lea MA, Koch MR. 1979. Effects of cyanate, thiocyanate, and amygdalin on metabolite uptake in normal and neoplastic tissues of the rat. *Journal of the National Cancer Institute* **63**: 1279-1283.
- Lee SH, Oh A, Shin SH, Kim HN, Kang WW, Chung SK. 2017. Amygdalin contents in peaches at different fruit development stages. *Preventive nutrition and food science* **22**: 237-240.
- Lehmann P. 1977. Laetrile: the fatal cure. *FDA Consumer* **11**: 10-15.
- Li H, Subbiah V, Barrow CJ, Dunshea FR, Suleria HAR. 2021. Phenolic profiling of five different australian grown apples. *Applied Sciences*. DOI: [org/10.3390/app11052421](https://doi.org/10.3390/app11052421).
- Liflandský VG. 2006. *Obecná charakteristika vitamínů a minerálů. Od A do Z*. Neva, Petrohrad.
- Lim YS, Lee SS, Tan BC. 2013. Antioxidant capacity and antibacterial activity of different parts of mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn.) extracts. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. DOI: [10.1051/fruits/2013088](https://doi.org/10.1051/fruits/2013088).
- Liu X, Fan K, Song WG. 2019. Optimization of accelerated solvent extraction of fatty acids from *Coix* seeds using chemometrics methods. *Food Measure* **13**. DOI: [10.1007/s11694-019-00095-7](https://doi.org/10.1007/s11694-019-00095-7).
- Lucas B, Sotelo A. 1983. A simplified test for the quantitation of cyanogenic glucoside in wild and cultivated seeds. *Nutrition reports international* **29**: 711-719.
- Luzón-Quintana LM, Castro R, Durán-Guerrero E. 2021. Biotechnological processes in fruit vinegar production. *Foods* **10**. DOI: [10.3390/foods10050945](https://doi.org/10.3390/foods10050945).
- Makarević J, Rutz J, Juengel E. 2014. Amygdalin blocks bladder cancer cell growth in vitro by diminishing cyclin A and cdk2. *PLOS One*. DOI: [10.1371/journal.pone.0105590](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105590).
- Manyakhin AY, Koldaev VM. 2019. Amygdalin v plodech rostlin z čeledi *Rosaceae* rostoucích v Primorje. *Pacific Medical Journal* **2**: 62-64.
- Mašín D. 2011. *Fyzickogeografická charakteristika CHKO Český ráj* [MSc. Thesis]. Available from <https://dspace.tul.cz/handle/15240/55923> (accessed February 2023).
- Megarbane B, Delahaye A, Goldgran-Toledano D, Baud FJ. 2003. Antidotal treatment of cyanide poisoning. *Jornal of the Chinese medical association*. **66**: 193-203.
- Milazzo S, Ernst E, Lejeune S, Boehm K, Horneber M. 2011. Laetrile treatment for cancer. *Cochrane Library: Cochrane Reviews*. DOI: [10.1002/14651858.CD005476.pub3](https://doi.org/10.1002/14651858.CD005476.pub3).

- Milazzo S, Horneber M. 2015. Laetrile treatment for cancer. Cochrane Database of systematic reviews 4:CD005476. DOI: 10.1002/14651858.CD005476.pub4.
- Milazzo S, Lejeune S, Ernst E. 2007. Laetrile for cancer: a systematic review of the clinical evidence. *Supportive Care Cancer* **15**: 583-595.
- Mildner-Szkudlar S, Bajerska J. 2013. Protective effect of grape by-product-fortified breads against cholesterol/cholic acid diet-induced hypercholesterolaemia in rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. DOI: 10.1002/jsfa.6171
- Moertel CG, Fleming TR, Rubin J. 1982. A clinical trial of amygdalin (Laetrile) in the treatment of human cancer. *New England Journal of Medicine* **306**: 201-206.
- Mohammed R, Muhsin Z. 2020. Phytochemistry and pharmacological activity of pear (*Pyrus Communis L.*). *Plant Archives* **20**: 7820-7828.
- Moon JY, Kim SW, Yun GM. 2015. Inhibition of cell growth and down-regulation of telomerase activity by amygdalin in human cancer cell lines. *Animal Cells and Systems* **19**: 295-304.
- Mukherjee PK. 2019. *Quality Control and Evaluation of Herbal Drugs: Evaluating Natural Products and Traditional Medicine*. Elsevier.
- National center for biotechnology information. 2004. PubChem Database. Hydrogen cyanide, CID=768. Available from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hydrogen-cyanide> (accessed February 2020).
- Naveena K, Chinniah C, Shanthi M. 2021. Cyanogenic glycosides and plant-herbivore interactions. *Journal of Entomology and Zoology Studies* **9**. DOI: 10.22271/j.ento.2021.v9.i1s.8327.
- Neznamova EG. 2007. *Environmentální toxikologie*. Tomská státní univerzita řídicích systémů a radioelektroniky, Tomsk.
- Onderka P. 2007. *Užovka stromová (Elaphe longissima) v oblasti Podyjí a Bílých Karpat* [MSc. Thesis]. LF MZLU, Brno.
- Opyd PM, Jurgoński A, Juśkiewicz J, Milala J, Zduńczyk Z, Król B. 2017. Nutritional and health-related effects of a diet containing apple seed meal in rats: the case of amygdalin. *Nutrients*. DOI: 10.3390/nu9101091.
- Oweis S, Wu L, Kiela PR, Zhao H, Malhotra D, Ghishan FK, Xie Z, Shapiro JI, Liu J. 2006.
- Pavlíková M. 2009. *Izolace a analýza arbutin* [MSc. Thesis]. Technická univerzita, Liberec.

- Petrovsky BV. 1988. Velká lékařská encyklopedie. Sovětská encyklopedie, Moskva.
- Piotrowski M, Schönfelder S, Weiler EW. 2001. The Arabidopsis thaliana isogene NIT4 and its orthologs in tobacco encode beta-cyano-L-alanine hydratase/nitrilase. The journal of biological chemistry **276**: 2616-2621.
- Plemenkov VV. 2001. Úvod do chemie přírodních látek. Kazanská federální univerzita, Kazan.
- Pramitha AR, Harijono H, Wulan SN. 2021. Comparison of cyanide content in arbil beans (*Phaseolus lunatus l*) of East Nusa Tenggara using picrate and acid hydrolysis methods. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 924. DOI: 10.1088/1755-1315/924/1/012031.
- Rajaei A, Barzegar M, Hamidi Z, Sahari MA. 2010. Optimization of extraction conditions of phenolic compounds from pistachio (*Pistachia vera*) green hull through response surface method. Journal of agricultural science and technology **12**: 605-615.
- Rajesh Y, Khan NM, Shaikh AR, Mane VS, Daware G, Dabhade G. 2022. Investigation of geranium oil extraction performance by using soxhlet extraction. Materials Today: Proceedings. DOI: /10.1016/j.matpr.2022.07.276.
- Raquel S, Jørgensen K, Olsen CE, Dicenta F, Møller BL. 2008. Bitterness in Almonds. American Society of Plant Biologists **146**: 1040-1052.
- Ravi SP, Sai Snehalatha K, Shaik. Tabassum F, Srinivasa BP. 2019. Applications of HPLC in pharmaceutical analysis. International journal of pharmaceutical sciences review and research **59**: 117-124.
- Rodríguez Madrera R, Suárez Valles B. 2021. Analysis of cyanogenic compounds derived from mandelonitrile by ultrasound-assisted extraction and high-performance liquid chromatography in *Rosaceae* and *Sambucus* families. Molecules. DOI: 10.3390/molecules26247563.
- Rodríguez-Concepción M & Boronat A. 2002. Breaking new ground in the regulation of the early steps of plant isoprenoid biosynthesis. Current Opinion in Plant Biology **5(4)**: 379-385.
- Roze LV, Chanda A, Linz JE. 2011. Compartmentalization and molecular traffic in secondary metabolism: a new understanding of established cellular processes. Fungal Genetics and Biology **48**: 35-48.
- Sagar NA, Pareek S, Sharma S. 2018. Fruit and vegetable waste: bioactive compounds, their extraction, and possible utilization. Comprehensive reviews in Food Science and Food Safety **17**: 512-531.

- Salama RH, Ramadan AER, Alsanory TA, Herdan MO, Fathallah OM, Alsanory AA. 2019. Experimental and therapeutic trials of amygdalin. *International Journal of Biochemistry and Pharmacology* **1**: 21-26.
- Saleh M, Amro L, Barakat H, Baker R, Reyash AA, Amro R, Qasem J. 2021. Fruit by-product processing and bioactive compounds. *Journal of food quality* **4**. DOI:10.1155/2021/5513358.
- Senica M, Stampar F, Veberic R, Mikulic-Petkovsek M. 2019. Cyanogenic glycosides and phenolics in apple seeds and their changes during long term storage. *Scientia Horticulturae* **255**: 30-36.
- Shahidi F, Wanasundara PK. 1997. Cyanogenic glycosides of flaxseeds. Pages 171-185 in Shahidi F., editor. *Antinutrients and phytochemicals in food*. ACS Symposium Serie 622.
- Shi J, Chen Q, Xu M, Xia Q, Zheng T, Teng J, Li M, Fan L. 2019. Recent updates and future perspectives about amygdalin as a potential anticancer agent: A review. *Cancer Medicine* **8**: 3004-3011.
- Státní zemědělská a potravinářská inspekce. 2009. Mandle, jak je neznáme. Available from <http://www.szpi.gov.cz/clanek/mandle-jak-je-nezname.aspx> (accessed December 2020).
- Tian HL, Zhan P, Li KX. 2010. Analysis of components and study on antioxidant and antimicrobial activities of oil in apple seeds. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. DOI: 10.3109/09637480903535772.
- Todorova A, Pesheva M, Iliev I, Bardarov K, Todorova T. 2017. Antimutagenic, antirecombinogenic, and antitumor effect of amygdalin in a yeast cell-based test and mammalian cell lines. *Journal of Medicinal Food* **20**: 360-366.
- Usai M, D'hallewin G. 1992. Cyanogenic glucosides contained in different organs of bitter and sweet almond. Pages 233-236 in EUR 14081 *Amélioration génétique de deux espèces de fruits secs méditerranéens: L'amandier et le pistachier*. Proceedings of the VIII Grempa Meeting. Nîmes, France.
- Vagazova GI. 2010. Léčivé rostliny – zdroj biologicky aktivních látek. *Vědecké poznámky Kazaňské státní akademie veterinárního lékařství pojmenované po NE Baumanovi* **203**: 44-48.
- Velíšek J, Hajšlová J. 2009. *Chemie potravin II*. Osis, Tábor.
- Walker R, Tseng A, Cavender G, Ross A, Zhao Y. 2014. Physicochemical, nutritional, and sensory qualities of wine grape pomace fortified baked goods. *Journal of Food Science* **79**: 1811-22.

- Wang W, Xiao XZ, Xu XQ, Li ZJ, Zhang JM. 2022. Variation in amygdalin content in kernels of six almond species (*Prunus* spp. L.) distributed in China. *Frontiers in Plant Science*. DOI: 10.3389/fpls.2021.753151.
- Wink M. 2010. *Annual plant reviews volume 40: biochemistry of plant secondary metabolism*. Blackwell Publishing Ltd. DOI:10.1002/9781444320503.
- Xing G, Yang JY. 2003. Advances in natural amygdalin. *Traditional Chinese patent medicine* **25**: 1007-1009.
- Xu S, Xu X, Yuan S, Liu H, Liu M, Zhang Y, Zhang H, Gao Y, Lin R, Li X. 2017. Identification and Analysis of Amygdalin, Neoamygdalin and Amygdalin Amide in Different Processed Bitter Almonds by HPLC-ESI-MS/MS and HPLC-DAD. *Molecules* **22**. DOI: 10.3390/molecules22091425.
- Yildiz K, Dokuzeylul B, Gonul R., Erman M. 2017. Cyanide poisoning in cattle. *Jornal of dairy and veterinary sciences* (e555567) DOI: 10.19080/JDVS.2017.01.555567.
- Yinrong Lu, Yeap Foo L. 1998. Constitution of some chemical components of apple seed. *Food Chemistry* **61**: 29-33.
- Yuan J, Zhong S, Long Y, Guo J, Yu Y, Liu J. 2022. Shikimate kinase plays important roles in anthocyanin synthesis in petunia. *International Journal of Molecular Sciences*. DOI: 10.3390/ijms232415964.
- Zhao Y. 2012. Amygdalin content in four stone fruit species at different developmental stages. *Science Asia* **38**: 218-222.

9 Seznam obrázků

Obrázek 1. Fenolové glykosidy. Jednoduché fenolické glykosidy. Available from <https://studfile.net/preview/5810922/page:3/> (accessed April 2020).

Obrázek 2. Flavony. Flavonoidy. Available from <https://ru.wikipedia.org/wiki/флавоноиды> (accessed April 2020).

Obrázek 3. Antokyany. Antokyany. Available from <https://ru.wikipedia.org/wiki/Антоцианы> (accessed April 2020).

Obrázek 4. Antrachinonový glykosid. Barbaloin. Available from <https://cs.wikipedia.org/wiki/Barbaloin> (accessed April 2020).

Obrázek 5. Glukosinoláty (Glukosinoláty. Available from <https://cs.wikipedia.org/wiki/Glukosinoláty> (accessed April 2020).

Obrázek 6. Obsah amygdalinu v peckovém ovoce (autorský obrázek).

Obrázek 7. Obsah amygdalinu podle odrůd jablek dle Bolarinwa et al. (2015)

Obrázek 8. Obsah amygdalinu podle odrůd jablek zakoupených a sebraných v ČR (autorský obrázek).

Obrázek 9. Obsah amygdalinu v jablkách odrůdy Golden Delicious různého původu (Mikulic-Petkovsek et al. 2019, Fadeeva 2022).

Obrázek 10. Obrázek 9. Bodový graf obsahu amygdalinu v semenech jablek (autorský obrázek).

10 Seznam použitých zkratk a symbolů

- AMK – aminokyselina
Spp – subspecies (plemeno, poddruh)
CID – compound identifier (identifikátor sloučeniny)
FDA – food and drug administration (Americká správa potravin a léčiv)
AMA – American medical association (Americká lékařská asociace)
ATP – adenosintrifosfát
FAO – the state of food and agriculture (stav potravinářství a zemědělství)
HPLC – high performance liquid chromatograph (vysoce výkonný kapalinový chromatografie)
UHT – ultra-high temperature processing (vysokoteplotní úprava)
SFE – supercritical fluid extraction (extrakce superkritickou tekutinou)
UAE – ultrasound-assisted extraction (extrakce ultrazvukem)
ASE – accelerated solvent extraction (zrychlená extrakce rozpouštědlem)
PFE – pressurized solvent extraction (extrakce tlakovou tekutinou)
PLE – pressurized fluid extraction (extrakce tlakovou kapalinou)
GC – gas chromatography (Plynová chromatografie)
RP-HPLC – reversed-phase HPLC (HPLC na reverzní fázi)
NP-HPLC – normal-phase HPLC (HPLC na normální fázi)
PVDF – polyvinylidenfluorid
PTFT – polytetrafluorethylen
PDA – detektor fotodiodového pole
C16:0 – palmitová kyselina
C16:1 – palmitolejová kyselina
C18:0 – stearová kyselina
C18:1 – elaidová kyselina
C18:2 – linolová kyselina
C18:3 – α -linolenová kyselina
C20:0 – arachová kyselina
C20:1 – eikosenová kyselina
C20:2 – eikosadienová kyselina
C22:0 – behenová kyselina
C24:0 – lignocerová kyselina