

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra kvality a bezpečnosti potravin**



**Česká zemědělská  
univerzita v Praze**

**NMR jako nástroj k výzkumu katabolismu polyfenolů  
v lidském trávicím traktu**

**Diplomová práce**

**Bc. Pavlína Koplíková**

**Kvalita a zpracování zemědělských produktů**

**doc. Ing. Jaroslav Havlík, Ph.D.**

© 2020 ČZU v Praze



### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " NMR jako nástroj k výzkumu katabolismu polyfenolů v lidském trávicím traktu" 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 24.07.2020

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Jaroslavu Havlíkovi, Ph.D. za jeho čas a cenné rady při vedení mé diplomové práce. Také bych ráda poděkovala Ing. Veronice Jarošové a Ing. Kateřině Tomisové nejen za jejich pomoc při zpracování vzorků, ale především za vstřícnost, ochotu a odborné rady při zpracování výsledků. Nakonec bych ráda poděkovala rodičům, bratrovi a příteli za podporu po celou dobu mého dlouhého studia a za to, že všichni věřili v jeho úspěšné zakončení.

# NMR jako nástroj k výzkumu katabolismu polyfenolů v lidském trávicím traktu

## Souhrn

Polyfenoly jsou přijímány jako součást rostlinné složky stravy. Můžeme je rozdělit na flavonoidy a neflavonoidní látky. Mezi neflavonoidní látky patří i kyselina ferulová, která byla v práci použita jako zástupce rostlinných polyfenolů. V procesu trávení a vstřebávání polyfenoly obecně většinou prostupují do tlustého střeva, kde jsou rozkládány na metabolity a bioaktivní vstřebatelné látky. Ty vykazují řadu příznivých účinků a mohou být zodpovědné za pozitivní efekt polyfenolů na lidské zdraví. Mohou také sloužit jako markery příjmu ovoce a zeleniny a markery metabolismu tlustého střeva pro klinické účely.

Nukleární magnetická rezonance (NMR) je rozvíjející se moderní nástroj využívaný jak v potravinářství za účelem odhalení falšování potravin, tak také pro účely metabolomické analýzy, ať už na kvantifikaci některých metabolitů nebo na profiling. Cílem práce bylo kromě zpracování rešerše ukázat možnost využití nukleární magnetické rezonance (NMR) při výzkumu katabolismu polyfenolů v lidském trávicím traktu.

Vzorky stolice 4 dárců byly fermentovány v médiu s přídavkem kyseliny ferulové jako zástupcem rostlinných polyfenolů. Byly sledovány změny ve spektrech a vznik metabolitů kyseliny ferulové v různých časech fermentace a to v 0 h, 4 h, 8 h a 24 h. K přiřazení signálů s kvantifikací jsme použili software Chenomx. Zároveň bylo provedeno měření kontroly (pouze inokulum) a pozitivní kontroly (pouze kyselina ferulová bez inokula).

**Klíčová slova:** polyfenoly, kyselina ferulová, metabolismus, fermentace, NMR

## Summary

The Polyphenols are part of vegetable meals. They can be divided into flavonoids and non-flavonoids. Non-flavonoid substances includes ferulic acid, which was used in this work as a representative of plant polyphenols. During digestion and absorption, polyphenols generally go to the colon, where they are decomposed into metabolites and bioactive absorbable substances. Former shows a lot of positive features and may have favourable effect on human health. They can also be markers of fruit and vegetable intake and markers of colon metabolism for clinical purposes.

Nuclear magnetic resonance (NMR) is an evolving modern tool both in the food industry for the purpose of detecting food adulteration and for the purposes of metabolomics analysis, where can be used for quantification some of the metabolites or for profiling

The aim of the work was to process the research and to show the possibility of using nuclear magnetic resonance (NMR) in research into the catabolism of polyphenols in the human gastrointestinal tract.

It was fermented stool samples from 4 donors in medium supplemented with ferulic acid as a representative of plant polyphenols. It was monitored changes in spectra and formation of ferulic acid metabolites at different fermentation times at 0 h, 4 h, 8 h and 24 h. Chenomx software was used for evaluation. At the same time, control measurements (inoculum only) and positive controls (ferulic acid without inoculum only) were measured.

**Keywords:** polyphenols, ferulic acid, metabolism, fermentation, NMR

# Obsah

<b>1 Úvod .....</b>	<b>9</b>
<b>2 Vědecká hypotéza a cíle práce.....</b>	<b>10</b>
<b>2.1 Cíl práce.....</b>	<b>10</b>
<b>2.2 Hypotéza .....</b>	<b>10</b>
<b>3 Polyfenoly .....</b>	<b>11</b>
<b>3.1 Rozdělení polyfenolů .....</b>	<b>12</b>
3.1.1 Flavonoidy .....	12
3.1.1.1 Flavonoly .....	13
3.1.1.2 Flavony .....	13
3.1.1.3 Flavan-3-oly.....	14
3.1.1.4 Flavanony .....	14
3.1.1.5 Anthokyanidiny .....	14
3.1.1.6 Isoflavony .....	15
3.1.2 Ne flavonoidní látky.....	16
3.1.2.1 Fenolové kyseliny .....	16
3.1.2.2 Stilbeny.....	17
<b>3.2 Význam polyfenolů.....</b>	<b>18</b>
3.2.1 Význam pro rostliny.....	18
3.2.2 Význam pro člověka.....	18
3.2.2.1 Antioxidační aktivita .....	18
3.2.2.2 Kardioprotektivní účinky .....	19
3.2.2.3 Protinádorové účinky .....	20
3.2.2.4 Antidiabetické a neuroprotektivní účinky .....	20
<b>4 Kyselina ferulová .....</b>	<b>21</b>
<b>5 Absorbce a metabolismus kyseliny ferulové .....</b>	<b>24</b>
<b>6 NMR jako analytický nástroj .....</b>	<b>26</b>
<b>6.1 Metabolomika a chemometrika .....</b>	<b>27</b>
<b>6.2 NMR biologických tekutin .....</b>	<b>27</b>
<b>6.3 NMR stolice .....</b>	<b>28</b>
<b>7 Materiál a metody .....</b>	<b>30</b>
<b>7.1 Chemikálie, materiál, zařízení a software .....</b>	<b>30</b>
<b>7.2 Fermentace .....</b>	<b>31</b>
7.2.1 Suroviny pro fermentaci.....	31

7.2.2	Postup fermentace .....	32
7.3	Analýza a vyhodnocení vzorků .....	32
8	Výsledky a diskuze .....	33
8.1	Ferulát.....	36
8.2	Kyselina hydroferulová .....	37
8.3	Kyselina 3,4-dihydroxyhydroskořicová .....	38
8.4	Kyselina 3-hydroxyfenyloctová .....	39
8.5	Kyselina 3-fenylpropionová .....	40
9	Závěr.....	42
10	Literatura .....	43
11	Seznam Obrázků a tabulek.....	50
12	Seznam příloh.....	51
13	Samostatné přílohy .....	I



# 1 Úvod

Polyfenoly jsou sekundární metabolity rostlin. Podílejí se na jejich obraně proti patogenům nebo třeba proti ultrafialovému záření. Jelikož se vyskytují v ovoci, zelenině, obilovinách nebo i nápojích jsou tudíž nedílnou součástí lidské stravy. Odhadem se příjem polyfenolů pohybuje okolo 1 g/den. Právě díky jejich poměrně vysokému příjmu v lidské stravě se v posledních letech stávají cílem vědeckých studií, které zkoumají jejich účinky a vliv na lidské zdraví. Hlavní vlastností polyfenolů je antioxidační aktivita, ale připisují se jim také antimikrobiální účinky, kardioprotektivní nebo i protinádorové účinky.

Kyselina ferulová, patřící mezi fenolové kyseliny, konkrétně do skupiny derivátů kyseliny skořicové, se kromě zeleniny hojně vyskytuje i v obilovinách, např. v ječmeni, pšenici, také v rýži nebo kukuřici. Stejně jako většina polyfenolů vykazuje antioxidační účinky a také antimikrobiální účinky, čehož může být využito i v potravinářství (například k ochraně proti kažení).

Pro identifikaci metabolitů polyfenolů a dalších látek, přítomných ve zkoumaném biologickém vzorku, se v dnešní době často využívají 2 analytické metody a to nukleární magnetická resonance (NMR) a hmotnostní spektrometrie (MS). NMR spektroskopie je analytická metoda, která na základě absorpce radiofrekvenčního záření vzorkem, který je umístěný v magnetickém poli poskytuje informace o struktuře zkoumané látky. Po svém objevu byla využívána především ve fyzice, kde měla ovšem omezené použití. S vývojem a lepším chápáním chemie se NMR začala a stále se používá jako analytická metoda. V dnešní době je využití NMR velmi široké, nejznámější je využití v lékařství jako diagnostická metoda. V chemii můžeme pomocí NMR určovat chemické struktury, či studovat reakční kinetiku. Také můžeme určovat prostorové struktury např. polysacharidů či DNA a RNA. Ve fyzice může být NMR využita ke studiu struktury materiálů. V potravinářství se NMR využívá k odhalování falšování potravin (alkohol, džusy, med). V neposlední řadě se v posledních letech rozvíjí využití NMR ke studiím metabolismu trávicího traktu a také v metabolomice, kde je výhodná díky svému vynikajícímu spektrálnímu rozlišení, které umožňuje poměrně rychlou a přesnou identifikaci metabolitů nejčastěji v moči, krevním séru a také ve stolici. Studie metabolismu pomocí NMR nám tak může poskytovat informace týkající se metabolických procesů v lidských orgánech, jako jsou játra, ledviny, tenké a tlusté střevo nebo dokonce mozek.

## **2 Vědecká hypotéza a cíle práce**

### **2.1 Cíl práce**

Cílem práce bylo sledovat rozklad polyfenolů, konkrétně kyseliny ferulové, střevní mikrobiotou a zároveň sledovat vznik potencionálních metabolitů rozkladu pomocí NMR spektroskopu, jakožto rychlé screeningové metody.

Vedlejším cílem bylo zpracování literárního přehledu, zabývajícího se polyfenoly, kyselinou ferulovou a NMR spektroskopii.

### **2.2 Hypotéza**

Kyselina ferulová je ve střevě rozkládána a dále metabolizována do vstřebatelných bioaktivních forem.

### 3 Polyfenoly

Epidemiologické studie posledních let nám ukazují, že strava bohatá na rostlinné produkty chrání člověka před degenerativními chorobami, jako je rakovina nebo kardiovaskulární onemocnění. Rostlinná strava obsahuje vlákninu, vitamíny, fytosteroly, sloučeniny síry, karotenoidy a organické kyseliny, které mají příznivý účinek na lidské zdraví, obsahují ale také řadu polyfenolů, které jsou stále více považovány za účinné ochranné látky. Jedním z hlavních cílů studií biologické dostupnosti polyfenolů je stanovit mezi stovkami různých dieteticky významných polyfenolů, které jsou lépe vstřebávány a které vedou k tvorbě aktivních metabolitů. Biologická dostupnost se mezi jednotlivými polyfenoly výrazně liší, což znamená, že polyfenoly, nejvíce se vyskytující v naší stravě nejsou nutně ty, které vedou k nejvyšší koncentraci aktivních metabolitů v cílové tkáni (Manach et al. 2005).

Polyfenoly jsou sloučeniny, které se přirozeně vyskytují ve velké míře v ovoci, zelenině, obilovinách nebo nápojích. Různé druhy ovoce, např. hrozny, jablka, hrušky nebo třešně mohou obsahovat 200-300 mg polyfenolů na 100 g čisté váhy. Také produkty, vyrobené z tohoto ovoce nebo zeleniny, obsahují významné množství polyfenolů (Pandey & Rizv 2009). Polyfenoly patří mezi tzv. sekundárním metabolity a jsou to deriváty pentózofosfátových, shikimátových a fenylypropanoidních drah v rostlinách. Hrají důležitou roli v růstu a reprodukci, poskytují ochranu proti patogenům a predátorům a přispívají k barevné a smyslové charakteristice rostlin. Kromě důležitých funkcí v rostlinách polyfenoly také vykazují širokou škálu prospěšných vlastností pro lidské zdraví, jako jsou antialergenní, protizánětlivé, antimikrobiální, antioxidační, antitrombotické, kardioprotektivní a vazodilatační účinky (C.M. Ajila et al. 2010). Během posledních 10 let se nejen vědci, ale také výrobci potravin stále více zajímají o polyfenoly. Hlavní důvodem je velké množství polyfenolů vyskytujících se v lidské stravě, jejich antioxidační vlastnosti a pravděpodobná role v prevenci různých onemocnění spojených s oxidačním stresem, jako je rakovina nebo kardiovaskulární choroby (Manach C, Scalbert A, Morand C 2004).

Fenolové sloučeniny jsou látky, které mají alespoň jeden aromatický kruh s jednou nebo více připojenými hydroxylovými skupinami. Jejich struktura je velice rozmanitá, mohou se vyskytovat od jednoduchých, nízkomolekulárních sloučenin s jedním aromatickým kruhem až po velké složité komplexy jako taniny a také deriváty polyfenolů. Klasifikovány jsou na základě počtu a uspořádání jejich atomů uhlíku. Běžně se vyskytují jako konjugáty s organickými kyselinami či sacharidy (Crozier & Clifford 2006), kdy jeden nebo více cukerných zbytků je spojen s hydroxylovými skupinami, ale existují i přímé vazby cukru (polysacharidu nebo monosacharidu) na aromatický uhlík.

## 3.1 Rozdělení polyfenolů

Polyfenoly představují jednu z nejpočetnějších skupin přírodních látek v rostlinné říši. V současné době je známo více než 8 000 fenolických struktur. Ačkoli polyfenoly jsou chemicky charakterizovány jako sloučeniny s fenolickými strukturami, je tato skupina velmi různorodá a obsahuje několik podskupin. Rozmanitost a široká distribuce polyfenolů v rostlinách vede k různým způsobům kategorizace těchto sloučenin. Polyfenoly byly klasifikovány podle zdroje původu, biologické funkce a chemické struktury (Tsao 2010).

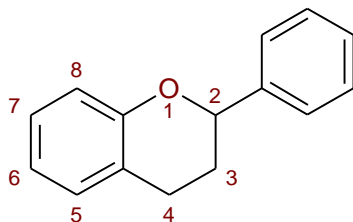
Polyfenoly mohou být rozděleny do různých skupin v závislosti na počtu kruhů, které obsahují a na strukturních prvcích, které tyto kruhy navzájem váží (Manach C, Scalbert A, Morand C, 2004). V této práci používám rozdělení na skupinu s flavonovým jádrem, flavonoidy a neflavonoidní látky.

### 3.1.1 Flavonoidy

Flavonoidy jsou nejvíce studovanou skupinou z polyfenolů. Jsou přítomny ve vysokých koncentracích v epidermis listů a pokožce plodů. V rostlinách jsou zapojeny do různých procesů, jako je UV ochrana, pigmentace, nebo odolnost vůči chorobám (Crozier & Clifford 2006). Doposud bylo zjištěno více než 4 000 druhů flavonoidů, z nichž mnohé jsou odpovědné za atraktivní barvy květin, ovoce a listů. V rostlinách se tvoří z aromatických aminokyselin fenylalaninu a tyrosinu (Pietta 2000).

Flavonoidy jsou polyfenolické látky s nízkou molekulovou hmotností, jejichž základem je flavonové jádro. Obrázek 1 ukazuje obecnou strukturu flavonoidů a číslovací systém, používaný k rozlišení pozic uhlíku kolem molekuly (Cook & Samman 1996). Společnou strukturou je difenylpropan ( $C_6-C_3-C_6$ ), který se skládá ze dvou aromatických kruhů, spojených třemi atomy uhlíku, které obvykle tvoří okysličený heterocykl (El Gharras 2009).

Biochemické aktivity flavonoidů a jejich metabolitů závisí na jejich chemické struktuře a relativní orientaci různých skupin na molekule. V rostlinách najdeme flavonoidy v různých strukturních formách a to jako aglykony (necukerná složka), v této podobě se ovšem vyskytují nejméně, dále jako glykosidy, glykosidové deriváty a methylované deriváty (Tapas, Sakarkar & Kakde 2008). Mezi hlavní třídy flavonoidů patří flavonoly, flavony, flavan3-oly, flavanony, antokyany a isoflavony.

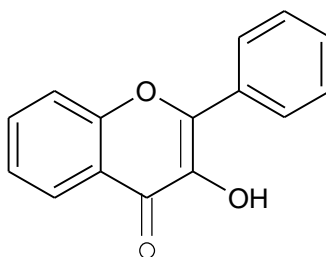


Obrázek 1 Flavonové jádro

### 3.1.1.1 Flavonoly

Flavonoly jsou nejrozšířenější skupinou flavonoidů v potravinách. Běžně se vyskytují v relativně nízkých koncentracích a to 15 až 30 mg/kg čisté hmotnosti. Nejbohatšími zdroji jsou cibule, pórek, brokolice, kapusta a borůvky. Také červené víno a čaj mohou obsahovat až 45 mg flavonolů/l (Manach C, Scalbert A, Morand C 2004).

Mezi hlavní zástupce patří kvercetin a kaempferol, dále pak ještě myricetin a isorhamnetin. Na obrázku 2 je znázorněna základní struktura. Flavonoly se nejčastěji vyskytují ve formě O-glykosidů (Crozier & Clifford 2006). Připojená cukrová skupina je velmi často glukóza nebo ramnóza, ale mohou být zahrnuty i jiné cukry (např. galaktóza, arabinóza, xylóza, kyselina glukuronová) (El Gharras 2009).

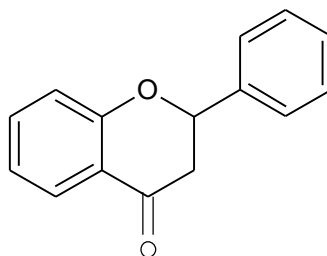


**Obrázek 2** Flavonol

### 3.1.1.2 Flavony

Flavony jsou strukturálně velmi podobné flavonolům. Jejich základní struktura (obrázek 3) se od flavonolů liší pouze chybějícím kyslíkem na C3. Většina flavonů se pak vyskytuje především jako 7-O-glykosidy (Crozier & Clifford 2006).

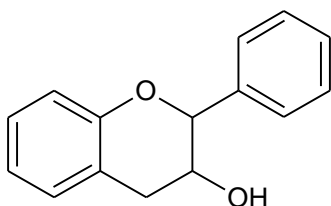
Mezi hlavní zástupce flavonů patří glykosidy luteonin a apigenin. Jako nejdůležitější zdroje těchto flavonů jsou identifikovány petržel a celer. Kromě luteoninu a apigeninu byly také identifikovány polymethoxylované flavony, mezi které patří tangeretin, nobiletin a sinensetin. Tyto látky se ve větším množství vyskytují ve slupkách citrusových plodů (El Gharras 2009).



**Obrázek 3** Základní struktura Flavonů

### 3.1.1.3 Flavan-3-oly

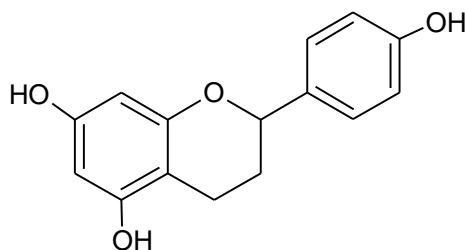
Flavan-3-oly nebo také flavanoly jsou nejsložitější podtřídou flavonoidů. Jde o širokou skupinu látek, od jednoduchých monomerů-katechinů a jejich izomerů epikatechinů, po oligomerní a polymerní proantokyanidiny, známé také jako kondenzované taniny. Na rozdíl od flavonů, flavonolů, isoflavonů a antokyanidinů, což jsou rovinné molekuly, flavan-3-oly, proanthokyanidiny mají v heterocyklickém kruhu nasycený C3 (obrázek 4) a proto rovinné nejsou. Mají také dvě chirální centra na C2 a C3, vytvářejí tedy čtyři izomery pro každou úroveň hydroxylace B-kruhu (Crozier & Clifford 2006). Flavan-3-oly se vyskytují zejména ve slupce hroznů, jablek a borůvek. Katechiny a epikatechiny a jejich deriváty jsou hlavními flavonoidy v čajových listech a kakaových bobech (Tsao 2010).



**Obrázek 4** Struktura flavan-3-olu

### 3.1.1.4 Flavanony

Flavanony se vyznačují nasyceným tříuhlíkovým řetězcem a atomem kyslíku na C4. Obvykle jsou glykosylovány disacharidem v poloze C7. Ve vysokých koncentracích jsou přítomny pouze v citrusových plodech, v menších množstvích se pak vyskytují také v rajčatech a některých aromatických rostlinách, jako je máta (Kushwaha & Karanjekar 2011). Hlavními aglykony jsou naringenin (obrázek 5) v grapefruitech, hesperetin v pomerančích a eriodictyol v citronech. Flavanony jsou obecně glykosylovány buď neohesperidózou, která dává hořkou chuť, nebo rutinózou, která je bez chuti (El Gharras 2009).



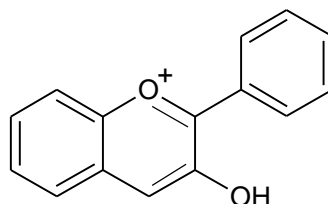
**Obrázek 5** Naringenin

### 3.1.1.5 Anthokyanidiny

Anthokyanidiny patří mezi jedny z nejvíce používaných přírodních barviv v potravinářském průmyslu. Jsou to nejdůležitější pigmenty cévnatých rostlin, u nichž jsou zodpovědné za oranžové, růžové, červené, fialové a modré barvy květin či plodů některých rostlin (Castañeda-Ovando et al. 2009). Antokyanidiny v rostlinách existují hlavně v glykosidických formách, které se běžně označují jako antokyany. Antokyanidiny se skládají z

aromatického kruhu A vázaného na heterocyklický kruh C, který obsahuje kyslík (obrázek 6) a je také vázán vazbou uhlík-uhlík na třetí aromatický kruh B (Kushwaha & Karanjekar 2011).

Nejrozšířenější antokyanidiny jsou kyanidin, delphinidin a pelargonidin, spolu s dalšími monomerními antokyanidiny (celkem známých 31 antokyanidinů). Barva antokyanů je závislá na pH (červená v kyselých a modrá v bazických podmínkách), ale i na dalších faktorech, jako je stupeň hydroxylace, methylace aromatických kruhů nebo glykosylace (Tsao 2010).

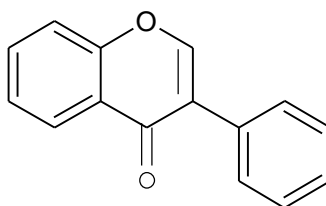


**Obrázek 6** Struktura anthokyanidinu

### 3.1.1.6 Isoflavony

Isoflavony patří do skupiny fytoestrogenů. Ty se vyskytují přirozeně v mnoha rostlinách a mají strukturální a funkční podobnost s lidským estrogenem.

Isoflavony se vyskytují téměř výhradně v luštěninách, kdy nejvyšší množství je obsaženo v sóji. Mohou se vyskytovat v podobě aglykonů nebo glykosidů, většina však obsahuje isoflavonové aglykony a to genistein, daidzein a glycitein. Jedním z dalších isoflavonů je také coumestrol, ačkoli je v sóji přítomen v mnohem nižších koncentracích než genistein, daidzein a glycitein (Munro et al. 2003). Základní struktura isoflavonů je zobrazena na obrázku 7. Obsah isoflavonů v sóji a v produktech ze sóje vyráběných se velmi liší v závislosti na zeměpisné poloze, podmínkách pěstování a zpracování. Sójové boby obsahují mezi 580 a 3 800 mg isoflavonů na kg čerstvé váhy a sójové mléko obsahuje mezi 30 a 175 mg/l (El Gharras 2009).



**Obrázek 7** Základní struktura isoflavonů

### 3.1.2 Neflavonoidní látky

Hlavními neflavonoidními látkami s dietetickým významem jsou fenolické kyseliny a stilbeny.

#### 3.1.2.1 Fenolové kyseliny

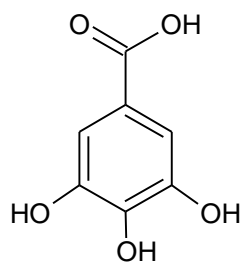
Fenolové kyseliny můžeme rozdělit do dvou podskupin na hydroxybenzoové kyseliny a hydroxyskořicové kyseliny. Čísla a poloha hydroxylových skupin na aromatickém kruhu vytváří různé struktury a sloučeniny fenolických kyselin. Hydroxybenzoové kyseliny mají společnou strukturu C6-C1 a patří mezi ně kyselina gallová, *p*-hydroxybenzoová, protokatechová, vanilová a syringová. Hydroxyskořicové kyseliny jsou naopak aromatické sloučeniny se třemi uhlíkovými postranními řetězci (C6-C3). Nejrozšířenějšími zástupci jsou kyselina kávová, ferulová, *p*-kumarová a sinapová (Ajila et al. 2011). Fenolové kyseliny se mohou v rostlinách vykytovat ve volné formě, jedná se však o menší část. Z větší části se vyskytují jako glykosidy nebo estery s jinými sloučeninami, jako jsou steroly, alkoholy, nebo glukosidy (Ghasemzadeh & Ghasemzadeh 2011). Volné a vázané fenolové kyseliny se nacházejí v obilovinách. Glykosidy kyseliny hydroxybenzoové jsou také charakteristické pro některé byliny a koření (Ramawat & Mérillon 2013).

Hlavním představitelem hydroxyskořicových kyselin je kyselina kávová, která se vyskytuje v potravinách hlavně jako ester s kyselinou chinovou. Tato sloučenina se pak nazývá kyselina chlorogenová (5-kofoylchinová kyselina). Hlavním zdrojem kyseliny chlorogenové v lidské stravě je káva. Denní příjem u lidí pravidelně pijících kávu je 0,5-1 g, zatímco u kávových abstinentů je příjem méně než 100 mg/den (Tapiero et al. 2002). Dalším představitelem je kyselina ferulová, o které bude více napsáno v další kapitole.

Hlavním představitelem hydroxybenzoových kyselin je kyselina gallová (3,4,5-trihydroxybenzoová kyselina). Tato kyselina je základní jednotkou gallotaninů, zatímco její část spolu s hexahydroxydifenylem jsou podjednotky ellagitanninů, které jsou klasifikovány jako hydrolyzovatelné taniny (Ramawat & Mérillon 2013). Molekula kyseliny gallové je planární a skládá se z aromatického kruhu, na němž jsou tři hydroxylové skupiny a skupiny karboxylové kyseliny (obrázek 8). Tyto tři hydroxylové skupiny jsou vázány k aromatickému kruhu v poloze ortho vzhledem k sobě navzájem. Právě toto uspořádání je hlavním determinantem silné antioxidační aktivity. Vyskytuje se ve volné formě nebo ve formě esterů (Badhani et al. 2015). Kyselina gallová je endogenní rostlinný polyfenol, který se hojně vyskytuje v čaji, hroznech, bobulích a jiných plodech a také ve víně. Nachází se také v některých rostlinách z tvrdého dřeva jako je dub, kaštan a mnoho dalších (Verma et al. 2013).

Fenolové kyseliny patří mezi skupinu látek, které jsou předmětem vědeckého zkoumání. Vysvětlení jejich role v rostlinném životě je jedním aspektem výzkumu, dalším je pak jejich úloha v kvalitě potravin. Fenolové kyseliny jsou spojovány s barevnými, smyslovými, nutričními a antioxidačními vlastnostmi. Jedním z podnětů pro analytická zkoumání je role, kterou mají tyto sloučeniny v organoleptických vlastnostech (chuť, aroma a tvrdost) potravin. Potravinářský průmysl dále zkoumá obsah a profil fenolových kyselin, jejich vliv na dozrávání ovoce, prevenci enzymatického hnědnutí a jejich roli jako potravinářských konzervačních látek (Robbins 2003).



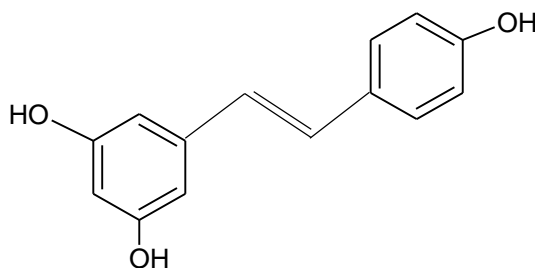


**Obrázek 8** Kyselina gallová

### 3.1.2.2 Stilbeny

Stilbeny jsou malá skupina sekundárních metabolitů rostlin, vzniklých z fenyylpropanoidů, charakteristické 1,2-difenyylethylenovou strukturou. Většina stilbenů je derivátem základní jednotky trans-resveratrolu (3,5,4-trihydroxy-transstilben) (Chong et al. 2009). Takto se nacházejí v játrovkách a některých kapradinách. Ve vyšších rostlinách jsou potom v monomerní formě, a jako di-, tri- a polymerní stilbeny, nazývány také jinak viniferiny (Cassidy-Aedin & Rosa-M 2000). Mezi hlavní fyziologické role stilbenů patří role fytoalexinů a růstových regulátorů. Existující stilbeny pomáhají chránit rostlinné tkáně před napadením houbami, hmyzem a jinými organismy. Mezi tyto stilbenové fytoalexiny patří resveratrol, jež je také neznámějším stilbenem vyskytujícím se v lidské stravě (obrázek 9) a jeho deriváty (Pugatch & Schroeder 2018).

Stilbeny jsou syntetizovány širokou škálou rostlinných druhů, např. šachorovité, borovicovité, bobovité, myrtovité, bukovité, liliovité nebo révovité a obvykle se vyskytují v kořenech, kůrách, oddencích a listech. Na základě dostupných údajů jsou hlavními zdroji stilbenů ve stravě hrozny, hroznové šťávy, víno, arašídý a arašídové máslo (Chung at al. 1992).



**Obrázek 9** Resveratrol

## 3.2 Význam polyfenolů

### 3.2.1 Význam pro rostliny

Flavonoidy a fenolové kyseliny jsou univerzální látky vyskytující se v rostlinné říši. Spolu s chlorofyly a karotenoidy patří mezi rostlinné pigmenty. Flavony, flavonoly a antokyanidiny mohou působit jako vizuální signály pro opylovače a to díky barvám, které rostlině či květu dávají. Katechiny a jiné flavanoly způsobují svíravou chuť, mohou tedy v rostlině představovat obranný systém proti hmyzu. Flavonoidy také chrání rostlinu před stresem a to tak, že v rostlinných buňkách odstraňují reaktivní druhy kyslíku (Stalikas 2007).

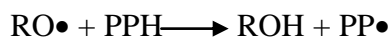
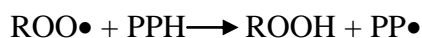
Pokud je rostlina vystavena velkému množství abiotického stresu, neschopna přizpůsobit produkci a spektrum fenolových sloučenin. Velké množství polyfenolických struktur, produkováných v různých orgánech, buňkách a subcelulárních kompartmentech je skutečně přítomno v každém jednotlivém rostlinném druhu (Agati et al. 2012). Polyfenoly, jako jsou fenolové glukosidy, deriváty kyseliny hydroxyskořicové a flavonoidy, se podílejí na zesílení buněčné stěny, čímž se mechanicky zvyšuje vyztužení tkání, což umožňuje rostlině lépe snášet sucho (Gunnaiah et al. 2012). Nedávno bylo také zjištěno, že biosyntéza polyfenolů v rostlinách prudce roste v reakci na vysoké sluneční světlo, za nepřítomnosti UV záření, při nedostatku dusíku, vody, při teple či naopak zimě a při salinitě kořenové zóny (Agati & Tattini 2010).

### 3.2.2 Význam pro člověka

#### 3.2.2.1 Antioxidační aktivita

Oxidační stres můžeme definovat jako nerovnováhu mezi tvorbou volných radikálů a reaktivních metabolitů, tzv. oxidantů nebo reaktivních kyslíkových druhů (ROS), a jejich eliminace ochrannými mechanismy, označovanými jako antioxidanty. Tato nerovnováha poškozuje důležité biomolekuly a buňky, což má potencionální dopad na celý organismus. Oxidační stres může v buňkách a tkáních poškozovat lipidy, proteiny nebo molekuly DNA. Následkem je pak poškození membrán, fragmentace nebo náhodné zesílení molekul, jako je DNA, enzymy a strukturální proteiny, a dokonce může dojít až k buněčné smrti. Oxidační stres tak vede k vývoji kardiovaskulárních chorob, rakoviny, neurodegenerativních poruch nebo cukrovky (Drahansky et al. 2016). Hlavními zdroji oxidačního stresu v buňkách jsou reaktivní druhy kyslíku a reaktivní formy dusíku, jako je hydroxylová skupina ( $\cdot\text{OH}$ ), peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), superoxid ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), oxid dusnatý ( $\text{NO}\cdot$ ), peroxyinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) (Orrenius, Gogvadze, & Zhivotovsky 2007). Antioxidanty mohou zpoždovat, zpomalovat nebo bránit oxidaci vychytáváním volných radikálů a tím snižovat oxidační stres. Polyfenoly mohou působit jako antioxidanty řadou potenciálních mechanismů a jsou vhodnými sloučeninami pro vychytávání volných radikálů i díky své chemické struktuře, protože mají: (1) fenolové hydroxylové skupiny, které jsou náchylné k darování atomu vodíku nebo elektronu volnému radikálu; (2) rozšířený konjugovaný aromatický systém pro přemístění nespárovaného elektronu. Nejdůležitějším antioxidačním mechanismem polyfenolů je jednak schopnost přerušit řetězovou reakci volných radikálů, potlačení tvorby volných radikálů regulací enzymové aktivity nebo také schopnost chelatace kovových iontů, zapojených do produkce

volných radikálů (Fraga et al. 2010). Konkrétně například flavonoidy fungují jako terminátory reakcí volných radikálů a chelátory kovových iontů, které jsou schopny katalyzovat peroxidaci lipidů. Účinek těchto antioxidantů spočívá v tom, že darují atom vodíku volnému radikálu, jak můžeme vidět v následujících reakcích:



Meziprodukty jsou fenoxi-radikály, které jsou relativně stabilní, proto nová řetězová reakce není snadno iniciována (Bravo L., 1998).

Bylo prokázáno, že polyfenoly inhibují řetězovou reakci oxidační degradace polynenasycených mastných kyselin integrovaných do micel, emulzí, liposomů, lipoproteinů s nízkou hustotou a živočišných tkání, které byly dříve indukovány různými prooxidanty (hydroxylové radikály, ionty železa, UV záření) (Vladimir-Kneevi et al. 2012).

### 3.2.2.2 Kardioprotektivní účinky

Řada studií nám ukázala, že konzumace polyfenolů omezuje výskyt srdečních chorob. Polyfenoly jsou silnými inhibitory LDL oxidace, přičemž tento typ oxidace je považován za klíčový mechanismus ve vývoji aterosklerózy. Kromě toho také polyfenoly mohou přispívat ke stabilizaci vznikajících aterosklerotických plátů (Aviram et al. 2000). Ukázalo se, že kvercetin může inhybovat exprese metaloproteáz a narušovat tak aterosklerotické pláty čímž nepřímo přispívá ke snížení míry výskytu srdečních chorob. Čajové katechiny pak inhibují proliferaci buněk hladké svaloviny v arteriální stěně, což je mechanismus, který může přispět ke zpomalení tvorby ateromatičtých lézí (Maeda et al. 2003). Účinky čaje na cévy a krevní tlak po jeho konzumaci jsou častým předmětem různých studií. Bylo například pozorováno, že konzumací 450 ml černého čaje dochází ke zvýšení dilatace tepny 2 hodiny po příjmu. V průřezové studii na skupině 218 žen ve věku nad 70 let, bylo zjištěno, že dlouhodobý a pravidelný příjem černého čaje snižuje krevní tlak. Bylo monitorováno vylučování kyseliny 4-O-methylgalové (4OMGA je biomarker pro čajové polyfenoly v těle). Vyšší spotřeba čaje a tedy vyšší vylučování 4OMGA, byla spojena s nižším krevním tlakem (Duffy et al. 2001).

Polyfenoly mohou také vykazovat antitrombotické účinky, prostřednictvím inhibice agregace destiček. Konzumace červeného vína nebo hroznové šťávy snižuje čas krvácení a agregaci destiček. Zároveň také konzumace vína zmírňuje trombózu, způsobenou zúžením koronární tepny (García-Lafuente et al. 2009). Resveratrol, polyfenol ve víně, zabraňuje agregaci destiček prostřednictvím inhibice aktivity cyklooxygenázy, která syntetizuje tromboxan A2, induktor agregace destiček a vazokonstriktor. Kromě toho studie také ukázaly, že resveratrol potenciálně inhibuje LDL oxidaci chelatací mědi nebo přímým vychytáváním volných radikálů (Pirola & Fröjdö 2008).

V několika epidemiologických studiích byla zkoumána souvislost mezi příjmem polyfenolů a konzumací potravin bohatých na polyfenoly a výskytem kardiovaskulárních onemocnění a bylo zjištěno, že konzumace stravy bohaté na polyfenoly byla spojena s nižším rizikem infarktu myokardu v obou případech, jak u kohortových studií tak u případových studií (Pandey & Rizv 2009).

### 3.2.2.3 Protinádorové účinky

Účinky polyfenolů na linie nádorových buněk jsou nejčastěji ochranné a napomáhají zpomalení či omezení růstu nádorů. Tyto účinky byly pozorovány díky *in vitro* studiím linií nádorových buněk z úst, žaludku, dvanáctníku, tlustého střeva, jater nebo plic. Byla testována řada polyfenolů, jako je kvercetin, katechiny, isoflavony, lignany, flavanony, kyselina ellagová, resveratrol a všechny testované sloučeniny vykazovaly u některých případů ochranné účinky, ačkoli jejich mechanismy působení jsou odlišné (Johnson, Williamson, & Musk 1994). Mezi mechanismy působení polyfenolů proti nádorové aktivitě patří estrogenní a antiestrogenní aktivita, antiproliferace, zastavení buněčného cyklu nebo apoptózy, prevence oxidace, indukce detoxikačních enzymů, regulace imunitního systému hostitele, protizánětlivá aktivita a změny v buněčné signalizaci (García-Lafuente et al. 2009).

Theaflaviny, vyskytující se v černém čaji, také vykazují silné protirakovinné vlastnosti. Tyto polyfenoly inhibují proliferaci a zvyšují apoptózu buněk u karcinomu prostaty. Vyšší hladina růstového faktoru-1 podobného inzulínu (IGF-1) je spojena s vyšším rizikem vzniku rakoviny prostaty. Přidání theaflavinu v dávce 40 mg/ml blokuje progresi buněk indukovaných IGF-1 do fáze S buněčného cyklu v buňkách karcinomu prostaty (Sharma & Rao 2009).

### 3.2.2.4 Antidiabetické a neuroprotektivní účinky

Jedním z dalších účinků, připisovaných polyfenolům, jsou antidiabetický účinek a neuroprotektivní účinek. Polyfenoly mohou ovlivňovat glykémii různými mechanismy a to tak, že inhibují absorpci glukózy ve střevech nebo její absorpci periferními tkáněmi. Byly pozorovány hypoglykemické účinky diacetylovaných antokyanů při dávce stravy 10 mg/kg u maltózy jako zdroje glukosy. To naznačuje, že tyto účinky jsou způsobeny inhibicí  $\alpha$ -glukosidázy ve střevní sliznici. Rovněž byla pozorována inhibice  $\alpha$ -amylázy katechinem v dávce asi 50 mg/kg stravy (García-Lafuente et al. 2009).

Neurodegenerativní onemocnění jsou způsobená poškozením makromolekul mozku a také oxidačním stresem. Protože polyfenoly jsou vysoce antioxidantní, může jejich konzumace zajistit ochranu před neurologickými chorobami. Bylo zjištěno, že lidé, kteří denně pijí tři až čtyři sklenky vína, mají o 80 % nižší výskyt demence a Alzheimerovy choroby ve srovnání s těmi, kteří pili vína méně nebo víno nepili vůbec (Pandey & Rizv 2009).

## 4 Kyselina ferulová

Kyselina ferulová, nebo taky 4-hydroxy-3-methoxyskořicová kyselina (obrázek 10) je kyselina hojně se vyskytující v rostlinné říši a může být mikrobiálně přeměňována na další hodnotné aromatické sloučeniny. Vyskytuje se v rostlinách ve volné formě a v buněčné stěně je kovalentně vázána na lignin a jiné polymery (Rosazza et al. 1995). Kyselina ferulová a její prekurzory, kyselina *p*-kumarová (*p*-hydroxyskořicová kyselina) a kyselina kávová (3,4-dihydroxyskořicová kyselina), jsou v rostlinách syntetizovány šikimátovou dráhou z fenylalaninu nebo L-tyrosinu (Bourne & Rice-Evans 1998). V rostlinách má tato kyselina několik důležitých rolí. Bylo zjištěno, že napomáhá strukturální pevnosti buněčné stěny a posiluje její architekturu zesíťováním pentosanových řetězců, arabinoxylanů a hemicelulóz, čímž činí tyto složky méně náchylné k působení hydrolytických enzymů v období během klíčení rostliny. Volné formy kyseliny ferulové působí při zesílení buněčných stěn rostlin a jsou také prekurzory různých antimikrobiálních sloučenin, signálních molekul a fytoalexinů, které hrají důležitou roli v obranných mechanismech rostlin (Dixon & Paiva 1995).

Ferulová kyselina je v potravinách především součástí vlákniny. Vyskytuje se v jednoděložných rostlinách (rýže, pšenice, oves), zelenině, květinách, ovoci, fazolích, semenech kávy, artyčocích, arašídech nebo ořeších. Buněčné stěny obilných zrn a dalších potravinářských rostlin (ananas, banány, špenát a červená řepa) obsahují 0,5-2 % extrahovatelného množství ferulové kyseliny, většinou v transizomerní formě a esterifikované specifickými polysacharidy (Kumar & Pruthi 2014). Obilné otruby obsahují jak významné množství kyseliny ferulové, tak i její oxidačně vázané produkty (diferuláty nebo dehydrodimery kyseliny ferulové). Diferuláty jsou silné antioxidanty, esterově vázané na polymery buněčné stěny a vyskytují se v různých formách (Belobrajdic & Bird 2013). Tyto sloučeniny jsou přítomny ve vysokém obsahu v žitných a pšeničných otrubách. Diferuláty mohou hrát důležitou roli ve stravě, protože například u vlákniny, ovlivňují její chemické struktury. Studie ukázaly, že esterifikované diferuláty mohou být z obilovin uvolněny střevními enzymy a volné diferuláty mohou být absorbovány a poté vstupovat do oběhového systému (Bunzel et al. 2001). Některé studie rovněž prokázaly, že diferuláty jsou účinnější antioxidanty než samotná kyselina ferulová. Obsah kyseliny ferulové v některých běžných druzích ovoce a zeleniny shrnuje tabulka 1. Kyselina ferulová tvoří asi 1,4 g/kg v zrnech ječmene, 8 g/kg v buničině z cukrové řepy, 9 g/kg v buněčné stěně endospermu rýže, 6,6 g/kg v pšeničných otrubách a 31 g/kg v kukuřičných otrubách (Mathew & Abraham 2006).

Kyselinu ferulovou je možné připravit z přírodních zdrojů třemi různými způsoby a to: (1) z nízkomolekulárních ferulových konjugátů, (2) z buněčných stěn rostlin a (3) tkáňovou kulturou nebo mikrobiální fermentací. Taniguchi et al. (1999) připravili kyselinu ferulovou ve velkém množství z oleje, vypuštěného při produkci z rýžových otrub. V tomto procesu byl odpad z otrubového oleje hydrolyzován hydroxidem sodným nebo hydroxidem draselným při 90-100 °C po dobu 8 hodin za atmosférického tlaku, čímž se získá surová kyselina ferulová s čistotou 70-90 %. Kyselina ferulová má nízkou toxicitu, LD<sub>50</sub> pro krysy je 2445 mg.kg<sup>-1</sup> pro samce, 2113 mg.kg<sup>-1</sup> pro samice. V Japonsku byla tato kyselina schválena jako potravinářské aditivum a používá se jako přírodní antioxidant do potravin, nápojů a kosmetiky. Také v USA a ve většině evropských zemí se pro vysoký obsah kyseliny ferulové vybírá řada přírodních

výtažků z bylin, kávy, vanilkových bobů, koření a dalších rostlin a ty se pak přidávají do potravin jako antioxidační směs (Graf 1992).

Jednou z důležitých vlastností kyseliny ferulové pro člověka je její antioxidační aktivita. Kyselina ferulová má schopnost zachycovat volné radikály peroxidu vodíku, superoxidů, hydroxylové radikály a oxid dusičitý. Skupiny přítomné na benzenovém kruhu (3-methoxy a 4-hydroxyl skupina), které poskytují elektrony, dávají kyselině jednu z vlastností a to možnost ukončení reakce radikálových řetězců. Karboxylová skupina s přilehlou nenasycenou dvojnou vazbou také může poskytnout další místa pro zachycení volných radikálů a tím jim zabránit v napadení membrány. Navíc tato skupina také působí jako kotva ferulové kyseliny, čímž se váže na lipidovou dvojvrstvu a poskytuje tak určitou ochranu před peroxidací lipidů (Srinivasan et al. 2007). Ou et al. (1999) pozorovali, že kyselina ferulová v koncentraci 250 mg l<sup>-1</sup> vychytávala 92,5 % hydroxylových radikálů při Fentonově reakci. Zhouen et al. (1998) ukázali pomocí pulzní radiolyzační techniky, že deriváty kyseliny hydroxyskořicové, včetně kyseliny ferulové, kyseliny sinapové a kyseliny kávové také zachycují radikály oxidu dusičitého. Kyselina ferulová nejen že vychytává volné radikály, ale také zvyšuje aktivitu enzymů, zodpovědných za toto vychytávání a inhibuje enzymy, které katalyzují produkci volných radikálů. Volné radikály jsou považovány za důležité faktory ve výskytu rakoviny. Protože antioxidanty (včetně kyseliny ferulové) jsou potenciální inhibitory několika druhů rakoviny, je jim věnována velká pozornost, především co se týká obsahu v potravinách.

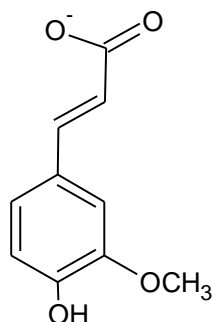
Díky své antioxidační aktivitě a schopnosti snižovat oxidační stres má kyselina ferulová i antidiabetický účinek. Jako antioxidant pomáhá neutralizovat volné radikály produkované streptozotocinem ve slinivce břišní a tím snižovat jeho toxicitu. Takto snížený antioxidační stres/toxicita na slinivce může pomoci beta-buňkám proliferovat a vylučovat více inzulínu. Tato zvýšená sekrece může pak zvýšit využití glukózy ve žlučových cestách, a tím snížit hladinu glukózy v krvi (Balasubashini et al. 2004).

V Číně se byliny bohaté na kyselinu ferulovou již dlouho používají k léčbě trombózy. Agregace destiček, jeden z mechanismů podílejících se na opravě poškozených krevních cév, souvisí s nemocemi, jako je trombóza. Vývoj sloučeniny schopné inhibovat agregaci destiček může tedy mít důležitý terapeutický význam. Kayahara et al. (1999) syntetizovaly tři typy derivátů kyseliny ferulové (benzyl ester feruloylové aminokyseliny, feruloylová kyselina a 4-O-[N-(karbobenzyloxy)aminoacyl] ferulové kyseliny). Uvádí, že především kyselina 4-O-[N-(karbobenzyloxy) aminoacyl] ferulové kyseliny může nejen zabránit trombóze, ale také rozpouštět již vytvořené tromby.

Jako další vlastnost kyseliny ferulové můžeme zmínit její protizánětlivé účinky. Chronický nebo akutní zánět je proces, zprostředkovaný zaktivněním zánětlivých nebo imunitních buněk. Bylo publikováno, že řada antioxidantů, včetně kyseliny ferulové a příbuzných esterových derivátů, snižuje hladiny některých zánětlivých mediátorů, např. prostaglandinu E2 a faktor nekrózy nádorů alfa (Ou et al. 2003) .

Kyselina ferulová vykazuje širokou škálu terapeutických vlastností. Kromě výše zmíněných se jí připisují také antiaterogenní, antiageingové, neuroprotektivní, radioprotektivní a hepatoprotektivní účinky. Mnoho z těchto aktivit lze připisat její silné antioxidační kapacitě. Snadno tvoří rezonančně stabilizovaný fenoxyllový radikál, který právě odpovídá za silný antioxidační potenciál. Kyselina ferulová dobře funguje ve všech antioxidačních přípravcích, vitamínových a bylinných doplňcích stravy. Lidský imunitní

system tak může těžit z příjmu této kyseliny. Tyto výzkumy a zprávy tak podporují myšlenku, že pravidelná konzumace kyseliny ferulové může organismu poskytnout podstatnou ochranu před různými chorobami spojenými s oxidačním stresem (Srinivasan et al. 2007).



**Obrázek 10** Kyselina ferulová

**Tabulka 1** Obsah kyseliny ferulové v ovoci a zelenině, upraveno dle Zhao a Moghadasian 2008

<b>Zdroj</b>	<b>obsah ferulové kyseliny (mg/0,1 kg)</b>
Lilek	7,3-35
Červená řepa	25
Sojové boby	12
Arašíd	8,7
Špenát	7,4
Rajče	0,29-6
Ředkev	4,6
Brokolice	4,1
Mrkev	1,2-2,8
Avokádo	1,1
Grapefruit	10,7-11,6
Pomeranč	9,2-9,9
Banán	5,4
Bobule	0,25-2,7
Rýže	24
Buničina z cukrové řepy	800

## 5 Absorbce a metabolismus kyseliny ferulové

V rostlinách dochází k tvorbě ferulové kyseliny tzv. šikimátovou cestou a to ze dvou klíčových aromatických sloučenin, kterými jsou L-fenylalaninu a L-tyrosinu. Nejprve se fenylalanin a tyrosin přemění na kyselinu skořicovou a *p*-kumarovou pomocí enzymů - lyáz (fenylalanin amonium a tyrosin amonium lyáza). Kyselina *p*-kumarová se pak převede na ferulovou kyselinu hydroxylací a methylací (Graf 1992). Kromě zkoumání metabolismu a absorbce kyseliny ferulové v trávicím traktu zvířat a člověka, je sledována i její mikrobiální transformace. Kyselina ferulová a její mikrobiální metabolity totiž mohou hrát roli v klíčení a růstu rostlin. Tyto sloučeniny ovlivňují složení mikroflóry v půdě tím, že inhibují růst určitých mikroorganismů a zároveň stimulují ostatní (Shafer & Blum 1991). Hydroxystyreny a další aromatické mikrobiální metabolity kyseliny ferulové jsou také důležitými chuťovými složkami piva, vína, sojové omáčky a ovocných šťáv. Kromě toho se kyselina ferulová také používá jako „ligninový fenolický substrát“ pro mikrobiální rozklad aromatických sloučenin z chemických a ropných průmyslových odpadů (Rosazza et al. 1995). Výskyt kyseliny ferulové v přírodě dal podnět k výzkumům ohledně možností jejího použití jako výchozího materiálu pro mikrobiální nebo enzymatickou syntézu užitečných aromatických sloučenin, jako je přeměna na vanillin (Huang, Dostal, & Rosazza 1993).

*In vivo* aktivita kyseliny ferulové silně závisí na její absorpci, dalším metabolismu a rozložení v tkáních. Absorbce kyseliny ferulové byla studována *in vivo* jak u zvířat, tak u lidí a to buď po příjmu ve formě čisté sloučeniny nebo obsažené v potravě (Silberberg et al. 2006). Kromě absorpce a metabolismu je předmětem studií také biologická dostupnost. Ke studiu biologické dostupnosti kyseliny ferulové byly použity kultury buněk Caco-2 jako *in vitro* model pro epitel tenkého střeva (Konishi & Shimizu 2003).

Hlavním a potenciálně nejdůležitějším místem absorpce kyseliny ferulové je tlusté střevo, protože se tato kyselina uvolňuje z mateřských sloučenin nebo potravinové matrice pomocí cinnamoyl esterázami. Tyto cinnamoyl esterázy se nacházejí hlavně v lumen tlustého střeva, pouze malé množství je pak v sliznici tenkého střeva a případně v pankreatických sekrecích (Couteau et al. 2001). Kyselina ferulová je navíc metabolitem kyseliny kávové a po methylaci kyseliny kávové katechol-*O*-methyltransferázou je vylučována zpět do lumen střevními buňkami, jak ukázala perfuze kyseliny kávové do tenkého střeva ve studiích na potkanech (Lafay et al. 2006). Protože kyselina kávová může být uvolněna aktivitou mikrobiální esterázy na chlorogenovou kyselinu, může se tak kyselina ferulová vyskytovat v tlustém střevě po požití jakéhokoli zdroje kyseliny chlorogenové. Kyselina ferulová nalezená v potravinách, esterifikovaná karboxylovými kyselinami, jako je kyselina chinová, by také mohla být uvolněna a absorbována do tlustého střeva za předpokladu, že tyto estery dojdou do střeva neporušené (Poquet, Clifford, & Williamson 2008).

Hlavní transport kyseliny ferulové je pasivní difuze. Ta je převážně transcelulární spíše než paracelulární, protože se dle dostupných studií zdá, že kyselina ferulová není omezena těsnými spoji a není ani závislá na jejich těsnosti. Prostup fenolických kyselin přes střevní epitel transcelulární difúzí se může objevit také v jiných tkáních, třeba v žaludeční sliznici, která je místem absorpce kyseliny ferulové, kávové, *p*-kumarové a gallových kyselin (Silberberg et al. 2006). Kromě pasivní transeculární difuze může být kyselina ferulová přenášena usnadněným transportem. Oba tyto mechanismy poskytují volnou kyselinu



ferulovou na serosální straně sliznice, pouze s malým množstvím konjugovaných forem. Nejdostupnější formou pro průchod střevní bariérou v těle je volná forma kyseliny, ale také malé procento konjugátů, feruloylglukuronid jako hlavní metabolit, následovaný síranem a kyselinou dihydroferulovou. Volná i konjugovaná forma by pak mohla být dále metabolizována játry (Poquet, Clifford & Williamson 2008).

*In vivo* studie metabolismu kyseliny ferulové naznačují, že se tato kyselina v epithelu střeva přeměňuje na řadu metabolitů, jako je sulfát ferulové kyseliny, glukuronid ferulové kyseliny, sulfoglukuronid ferulové kyseliny (hlavní metabolity v plazmě a moči potkanů), diglukuronid ferulové kyseliny, feruloylglycin, kyselina *m*-hydroxyfenylpropionová, kyselina hydroferulová, kyselina vanilová a vanilloylglycin (Zhao a Moghadasian 2008). Údaje z této studie naznačují, že hlavní metabolickou cestou kyseliny ferulové je konjugace s kyselinou glukuronovou anebo síranem. Ke konjugaci dochází hlavně v játrech prostřednictvím aktivních sulfotransferáz a uridin difosfátu (UDP) glukuronosyltransferázy. V menší míře probíhá konjugace také ve střevní sliznici a ledvinách (Zhao et al. 2003). Po požití je kyselina ferulová metabolizována a vylučována močí jako 3-hydroxyfenyl a 3-methoxy-4-hydroxyfenyl, deriváty fenylpropionové kyseliny a glycinových konjugátů.

Fyziologický význam kyseliny ferulové a zejména antioxidační vlastnosti závisí na její dostupnosti pro absorpci a následné interakci s cílovými tkáněmi. Je biologicky dostupnější než jiné, dosud zkoumané flavonoidy a oproti ostatním antioxidantům zůstává déle v krvi. V krvi zůstává déle než jiné antioxidanty, jako je třeba vitamin C. Předpokládá se, že kyselina ferulová zůstává v krvi dostatečně dlouho na to, aby pomohla zadržovat tvorbu volných radikálů (Beecher 1998). Za normálních podmínek 56,1 % perfundované ferulové kyseliny vstupuje do enterocytů, kde je snadno konjugována a výsledné metabolity opouštějí buněčné stěny právě pouze k serózní straně, jak již bylo uvedeno výše v textu, protože v střevním lumen nejsou detekovány žádné konjugované formy. Za těchto podmínek je 56,1 % perfundované kyseliny, odpovídající absorpci, vráceno do plazmy mezenterickou žilou jako konjugovaný derivát. Část těchto konjugátů vstupuje do hepatocytů a vylučuje se žlučí a 49,9 % perfundované dávky je distribuováno do periferních tkání a může mít biologické účinky (Srinivasan et al. 2007).

## 6 NMR jako analytický nástroj

NMR neboli nukleární magnetická rezonance, je důležitým analytickým nástrojem pro zjišťování struktury neznámých syntetických a přírodních sloučenin. Je založena na absorpci radiofrekvenčního elektromagnetického záření (desítky-stovky MHz) jádru některých atomů v molekulách analyzovaných látek (vzorků) umístěných v magnetickém poli. NMR spektroskopie s vysokým rozlišením je kvantitativní a nedestruktivní technika. Jedná se o robustní a spolehlivou analytickou metodu s nejvyšší reprodukovatelností a opakovatelností.

Jeho velká výhoda spočívá v tom, že poskytuje přístup jak ke kvalitativním, tak i kvantitativním informacím (Simmler et al. 2014). Na rozdíl od hmotnostní spektrometrie je NMR až o několik řádů méně citlivou technikou. Odstranění této nevýhody je v současné době možné postupným vylepšováním v instrumentaci. Vylepšením v instrumentaci a technologii NMR jsou stíněné magnety s vysokým polem, kryo-sondy, techniky potlačování rozpouštědel a všestranné pulzní sekvence. To vše vede k pronikání NMR do oblasti metabolomiky a kvantifikace. V dnešní době jsou kvantitativní měření NMR (qNMR) přinejmenším stejně tak spolehlivá a přesná jako měření běžně používanými chromatografickými technikami, přičemž NMR poskytuje několik výhod, včetně jednoduchého vývoje metody a snadné přípravy vzorku (Bharti & Roy 2012). NMR je vysoce selektivní nedestruktivní technika s pouze minimálními nároky na úpravu vzorku. NMR spektra odrážejí výhradně fyzikální vlastnosti studované látky a jsou jen minimálně ovlivněna vnějšími faktory. Experimenty jsou tedy velmi dobře reprodukovatelné a k identifikaci lze snadno použít databáze spekter (Pelantová H. 2015).

Mezi hlavní aplikace jednorozměrné (1D) kvantitativní protonové  $^1\text{H}$  NMR (qHNMR) patří hodnocení čistoty organických sloučenin a identifikace potenciálních nečistot. qHNMR se také stala cennou technikou pro analýzu komplexních směsí a ke kvantifikaci více složek bez potřeby chromatografické separace. Díky své téměř univerzální detekční schopnosti nabízí qHNMR objektivní přehled o složení vzorku. Tato výhoda je velmi užitečná pro metabolomické studie, které představují druhou hlavní aplikaci qHNMR (Kim, Choi & Verpoorte 2010).

V současné době roste zájem o použití qHNMR při analýze potravin především kvůli mnoha výhodám oproti běžně aplikovaným chromatografickým metodám. Výhodou qNMR při studiu metabolických a fermentačních procesů, složení potravin a technologii potravin je jednoduchost a rychlost implementace. Nedávné studie ukazují, že qHNMR je vhodná pro monitorování *in situ* různých fermentačních fází u vína, mléka a čaje; ke kvantifikaci konzervačních látek, benzoové a sorbové kyseliny, ve zpracovaných potravinách (Marccone et al. 2013). Cílem studií na potravinách jsou dvě třídy primárních metabolitů. Na jedné straně jsou to ve vodě rozpustné organické kyseliny, aminokyseliny a cukry a na druhé straně mastné kyseliny, které jsou důležité pro výživu a organoleptické vlastnosti. Všechny studie prokázaly, že qHNMR je dostatečně přesná, reprodukovatelná a specifická, a to buď pro kvantifikaci konzervačních látek v komplexních maticích, jako je třeba margarín či masné výrobky, nebo pro stanovení složení řetězců mastných kyselin v jiných potravinářských výrobcích (Ohtsuki et al. 2012).

## 6.1 Metabolomika a chemometrika

Metabolomika, tj. komplexní analýza metabolomu za konkrétního fyziologického nebo vývojového stádia organismu, tkáně či buňky.

Profilování metabolitů a fingerprinting jsou dva přístupy zaměřené na analýzu metabolomu (celé sady metabolitů) v daném biologickém systému. Fingerprinting je rychlá a kompletní analýza vzorku bez nutné identifikace a kvantifikace jednotlivých metabolitů. Profilování metabolitů oproti tomu zahrnuje identifikaci a částečnou kvantifikaci vybraného počtu metabolitů náležících do třídy chemicky podobných sloučenin (např. polární lipidy, isoprenoidy nebo sacharidy) nebo společně zapojených do specifické metabolické dráhy (Usilová & Latz 2011). Metabolomika se stala jednou z hlavních aplikací qHNMR. Protože qHNMR obvykle pokrývá pouze část metabolomu, která přesahuje určitou hodnotu prahové koncentrace (1–5  $\mu\text{M}$ ), je často kombinován s citlivějšími analytickými technikami (např. LC MS). K získání užitečných informací o toku materiálů metabolickými cestami jsou často používány izotopicky značená jádra  $^{13}\text{C}$  a  $^{15}\text{N}$ . Metabolomika zahrnuje velké množství vzorků a výsledná spektra bývají obecně složitá, s mnoha překrývajícími se signály. Proto je důležité a je vyžadováno zpracování dat prostřednictvím multivariační analýzy v kombinaci se statistikami (Savorani et al. 2013).

Chemometrika využívá matematické a statistické metody k uspořádání velkého množství experimentálních dat. Chemometrické metody jsou nezbytné pro extrakci a popis rozdílů ve spektech a pro vyhodnocení změn ve velkých sadách NMR spekter pro skupinovou klasifikaci (tj. rozpoznávání vzorů). Nejpoužívanějšími metodami rozpoznávání vzorů jsou částečná analýza nejmenších čtverců (PLS-DA) a analýza hlavních komponent (PCA) (Zhang & Powers 2012).

## 6.2 NMR biologických tekutin

Biologické tekutiny, jako je moč a plazma, jsou snadno získatelné vzorky, které nevyžadují extrakci z tkáně, odběr tedy není invazivní. Ve většině případů je lze analyzovat bez další koncentrační úpravy a lze dosáhnout vysoké vzorkovací frekvence. Díky tomu jsou biologické tekutiny nejvhodnější a nejčastější vzorky pro metabolomickou analýzu. V posledních letech se význam lidské metabolomiky, založené na qHNMR, značně zvýšil, protože pomáhá rozlišit nemocné a zdravé stavy, nebo rozlišení mezi léčenými a neléčenými skupinami. Kromě toho byla qNMR úspěšně použita také při identifikaci biomarkerů spojených s různými onemocněními. Kromě klasické metabolomiky existuje také nutriční metabolomika. Nutriční metabolomika byla aplikována na studium lidského metabolomu, jejím cílem je tedy zkoumat biomarkery příjmu potravy a nemoci životního stylu. NMR, na rozdíl od jiných analytických metod, má jedinečnou schopnost měřit lipoproteiny a obsah triacylglyceridů ve vzorcích krve a to díky citlivosti na fyzikální jevy, jako je difúze nebo rotační pohyb (A. Zhang et al. 2012). Neporušené tkáně mohou být analyzovány přímo, bez komplikované přípravy vzorku, a to s použitím NMR s vysokým rozlišením magického úhlu (HR-MAS). *Ex vivo* HR-MAS NMR poskytuje taková spektra, která umožňují prostorové rozlišení metabolitů a také léčiv, proto nabízejí komplementární přístup k histologii. HR-MAS NMR je tedy velmi účinnou technikou pro identifikaci a kvantifikaci různých

biomarkerů rakoviny, ale i pro klasifikaci a prognózu různých nádorů a hodnocení účinnosti léčby (Serkova & Brown 2012).

Vývoj Fourierovy transformace na konci 60. let a implementace supravodivých magnetů v 70. letech umožnily začátek aplikace NMR spektroskopie pro profilování metabolitů z biologických tekutin. První skutečná aplikace NMR k jejich analýze pochází z počátku 80. let. Další technická vylepšení v 90. letech, konkrétně silnější magnetická pole a zavedení kryochlazených NMR sond, vedly k enormnímu zvýšení citlivosti NMR. Dnes se detekční limit koncentrace metabolitů pohybuje řádově v mikromolech ( $\mu\text{M}$ ). Přestože se citlivost NMR enormně zvýšila a stále se zlepšuje, ve srovnání s MS zůstává slabým místem. Možným slibným řešením tohoto problému je nedávný vývoj spinové hyperpolarizace skrz dynamicko-jadernou polarizaci nebo hyperpolarizaci indukovanou para-vodíkem (Hamans et al. 2011). Kromě toho zvýšení intenzity magnetického pole výrazně zlepšilo rozlišení. Dnes je metabolomika exponenciálně rostoucí obor, ve kterém se využívá NMR spolu s MS rovným dílem. Jak již bylo zmíněno, velmi důležitou výhodou NMR spektroskopie, a to nejen pro metabolické profilování, je kvantitativnost a to, že nevyžaduje časově náročnou přípravu vzorku, jako je separace nebo derivatizace. Kromě toho nevyžaduje předchozí znalosti o sloučeninách přítomných ve vzorku, a proto je ideální pro necílené profilování (Smolinska et al. 2012).

### 6.3 NMR stolice

Zkoumání metabolomu je zatím převážně aplikováno na moč a plazmu a poskytuje informace o exogenním a endogenním metabolismu hostitele. Zkoumání metabolomu přes stolicu má velký potenciál pro posouzení vlivu střevní mikrobioty na regulaci metabolismu hostitele. Screening vzorků stolice má oproti jiným screeningovým metodám několik výhod. Je neinvazivní a v zásadě odráží stav celé délky střev (Renema et al. 2007). Často využívanou metodou pro analýzu polyfenolů ve stolici je cílená plynová chromatografie.  $^1\text{H-NMR}$  byla vyvinuta nejen pro měření širokého spektra metabolitů ve střevech, ale také k získání širšího pohledu na změny metabolitů v závislosti na stravě.

Stolice je vysoce heterogenní maticí a rozdíly mezi jednotlivými vzorky jsou viditelné na první pohled. Hlavním zdrojem nehomogenity je nepravidelný výskyt nestrávených zbytků potravin. Nejzjevnějším rozdílem mezi vzorky různých dárců je, variace barvy vzorků, která může být způsobena měnící se koncentrací barviv z potravy a vylučovanými jaterními metabolity, jako jsou např. deriváty bilirubinu. Rozdílná je samozřejmě také konzistence jednotlivých vzorků, která se může měnit v závislosti například na nedostatku pitné vody či nižším příjmu vlákniny jednotlivých dárců, což má poté velký vliv na obsah fekální vody. Tyto silné interindividuální rozdíly obsahu vody mohou ztěžovat srovnávání koncentrací metabolitů (Moosmang et al. 2019)

Protože stolice je takto heterogenní, je nezbytné provést správnou, optimální a rychlou přípravu vzorku k následné analýze. Nejen u stolice ale obecně u biologických vzorků je třeba zabránit enzymatické degradaci, např. prudkým zchlazením vzorku v kapalném dusíku a poté homogenizací vzorku a denaturací kyselinami či organickými rozpouštědly; lyofilizace pak zbaví vzorek zbytků vody (Pelantová H. 2015).

Mezi nejčastěji zkoumané polyfenoly a jejich metabolity patří polyfenoly červeného vína nebo čaje a častěji, než ve stolici jsou zkoumány jejich metabolity v moči, nebo také v krvi. V současné době není příliš mnoho dostupných studií, věnujících se *in vitro* analýze metabolismu polyfenolů (a konkrétně i metabolismu kyseliny ferulové) v tlustém střevě, respektive analýze stolice, pomocí NMR. Často se k této analýze využívají analytické metody, jako je kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem. Protože příprava vzorků pro měření na NMR je poměrně rychlá, stejně jako samotné měření, zvolili jsme právě tuto metodu pro praktickou část diplomové práce s cílem ukázat, že jde o rychlou a účinnou metodu k pozorování metabolismu polyfenolů v lidském trávicím traktu.

## 7 Materiál a metody

### 7.1 Chemikálie, materiál, zařízení a software

Použité chemikálie pro přípravu vzorků:

- $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$
- $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeCl}_3$
- trypton, glukosa, maltosa, resazurin, vitamín K1, hemin
- cystein hydrochlorid, 1M NaOH,  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$
- plynný dusík OFN
- 6M HCl
- kyselina Ferulová
- dimethylsulfoxid

Použitý spotřební materiál:

- Mikrozkušavky značky VWR 1,5 ml (CZ)
- Pipetovací špičky značky Eppendorf (CZ)
- NMR kyvety Norell 5 mm, High-Throughput 7“ Standard series (USA)
- Jednorázová odběrová sana na odběr stolice složená z odběrového papíru TOKS – Lab Mark (CZ), plastové zkumavky s víčkem, jehož součástí je naběrátko a z nitrilových rukavic

Použité přístroje:

- Pipety VWR 20–200  $\mu\text{l}$  a 100–1000  $\mu\text{l}$  (CZ)
- Ultra mikrováha Mettler Toledo XPR6UD5 (USA)
- Vortex IKA MS 3 Basic (DE)
- Centrifuga Rotanta 460R Hettich Zentrifugen (DE)
- NMR spektrometr Avance III Bruker s 1H frekvencí 500,23 MHz (DE)
- Topspin 3.5 pl7, Bruker (DE)
- Chenomx NMR suite 8.4, Chenomx Inc. (CA)
- IBM SPSS Statistic
- Program Statistica (StatSoft CR s.r.o.)
- Microsoft excel

## 7.2 Fermentace

### 7.2.1 Suroviny pro fermentaci

Pro fermentaci byly použity vzorky stolice od čtyř dárců a fermentační roztok. Fermentační roztok byl složený z fosátového pufru, fermentačního média a redukčního roztoku viz tabulka 2. Zásobní roztoky byly připraveny smícháním jednotlivých složek.

**Tabulka 2** Potřeba jednotlivých složek pro přípravu zásobních roztoků, dle protokolu

CO <sub>3</sub> pufr	4 g NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> 35 g NaHCO <sub>3</sub> voda do objemu 1 L
Makrominerální roztok	5,7 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 6,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,3 g MgSO <sub>4</sub> voda do objemu 1 L
Mikrominerální roztok	2,5 g CaCl <sub>2</sub> 2,5 g MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O 0,25 g CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O 1,25 g FeCl <sub>3</sub> voda do objemu 25 ml.
Fosfátový pufr (pH = 7,0 při 20 °C)	1/15M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (3,54 g/390 ml) 1/15M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (5,78 g/610 ml)
Fermentační médium	2,25 g tryptonu, 2,25 g glukosy, 1,125 g maltosy, 0,54 mg vit. K, 5,36 heminu, rozpuštěné v 450 ml destilované vody 112,5 µl mikrominerálního roztoku 225 ml CO <sub>3</sub> pufru 225 ml makrominerálního roztoku 1,125 µl 0,1% roztoku resazurinu
Redukční roztok	312,5 mg cystein hydrochlorid 2 ml 1M NaOH 101,5 mg Na <sub>2</sub> S · 9 H <sub>2</sub> O voda do objemu 50 ml

### 7.2.2 Postup fermentace

Vzorky stolice byly odebrány od čtyř zdravých dobrovolníků. Tito dobrovolníci byli bez anamnézy gastrointestinálního onemocnění a bez antibiotické léčby po dobu alespoň 3 měsíců před experimentem. Dobrovolnice nebyly těhotné ani kojící. Všichni účastníci dali svůj informovaný souhlas se zařazením dříve, než se zúčastnili studie. Vzorky byly odebrány do 1 l plastové nádoby, svázané v plastovém sáčku s GENbag anaer (Biomérieux, Lyon, Francie) a udržovány při 37 ° C po dobu maximálně 2 h.

Vzorek čerstvé stolice od dárce (48 g) byl homogenizován ve stomacheru (Laboratory Blender, Stomacher® 400 Circulator, EU) po dobu 30 s společně s fosfátovým pufrem (150 ml) a následně přefiltrován přes nilonový filtr. Výsledná homogenizovaná směs měla koncentraci 32 %.

Kyselina ferulová (18 – 20 mg) byla rozpuštěna v dimethylsulfoxidu (DMSO) na koncentraci 10 mg/ml, kdy finální koncentrace DMSO v roztoku byla 0,5 %.

Dále bylo povařeno 120 ml fosfátového pufru a 500 ml fermentačního média (7 minut). Povařený roztok byl zchlazen na teplotu asi 37 ° C a pH bylo upraveno pomocí 6M HCl na hodnotu 7,0. V dalším kroku bylo odpipetováno 16,8 ml připraveného roztoku do 20ml fermentačních vialek, které byly uzavřeny PTFE uzávěrem a aluminiovým krimpovacím víčkem. Po uzavření bylo přes víčko přidáno 0,8 ml redukčního roztoku. Následně bylo přidáno 20 µl testované látky a 2 ml připravené 32% směsi stolice.

V definovaných časových intervalech 0 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h byly z fermentačních nádobek přes septum odebírány vzorky (3 ml) pro analýzu do plastových zkumavek. Fermentace probíhala na horizontální třepačce (Heidolph 100, DE) při tělesné teplotě 37 ° C a s frekvencí třepání 100/min. Vzorky pro analýzu byly uchovávány při teplotě – 80 ° C.

### 7.3 Analýza a vyhodnocení vzorků

Pro analýzu byl použitý NMR spektrometr Bruker Avance III, s operační 1H frekvencí 500,23 MHz při teplotě 298 K, metodou 1D NOESY. Bylo pořízeno celkem 128 skenů, počet datových bodů 32k, šířka spektra 164 ppm. Akviziční čas byl 4 s, presaturační čas 1 s a směšovací čas 100 ms. Byl aplikován zero-filling na 128k. Výsledná spektra byla manuálně upravena v programu Topspin, ve kterém byla provedena Fourierova transformace, exponenciální amplifikace, korekce fáze a baseline a úprava reference na signál TSP (0,000 ppm). Metabolity byly identifikovány u každého spektra databází programu Chenomx a pomocí dostupných publikovaných vědeckých článků. Data byla zpracována v programu International Business Machines SPSS Statistics 25, Microsoft excel a programem Statistica.



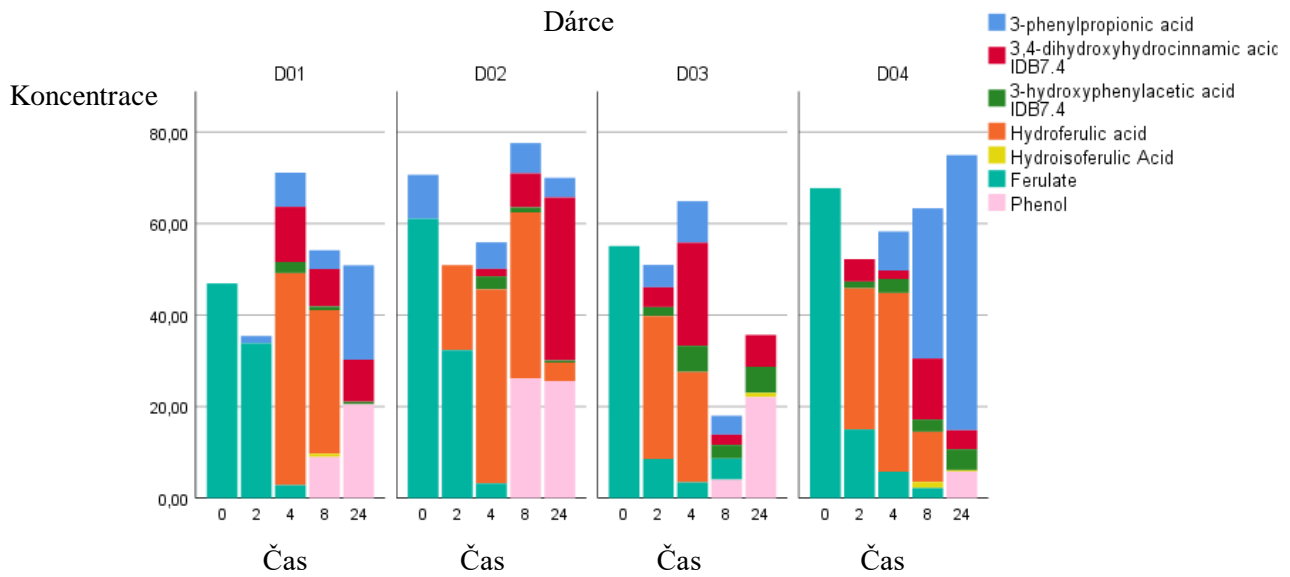
## 8 Výsledky a diskuze

Lidský gastrointestinální trakt (GIT) je vysoce komplexní mikrobiální ekosystém, který obsahuje několik stovek různých druhů bakterií, z nichž většina se nachází v tlustém střevě. Mikrobiota tlustého střeva získává energii, uhlík a dusík pro svůj růst z fermentace potravy a některých endogenně poskytnutých substrátů. Metabolická aktivita mikrobioty tlustého střeva je velmi rozmanitá může mít dopad na výživu a zdravotní stav člověka (Couteau et al. 2001). Protože právě tlusté střevo obsahuje nejvíce bakterií z celého GIT, předpokládáme proto, že největší množství metabolitů vznikne právě v této oblasti.

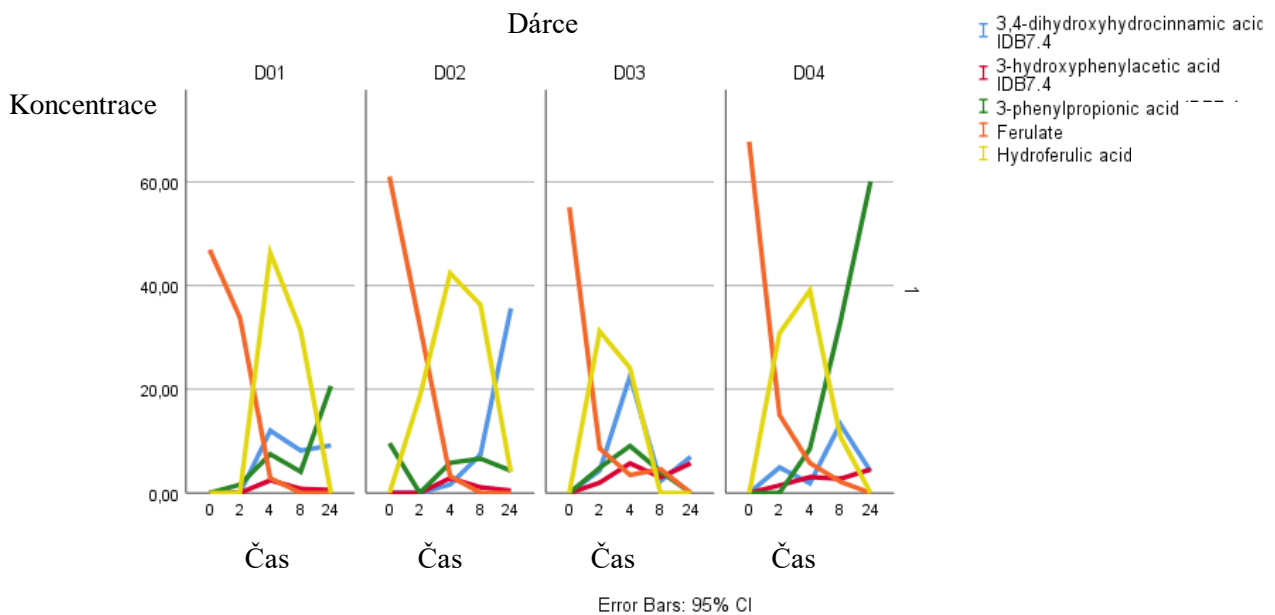
K analýze metabolismu kyseliny ferulové v lidském tlustém střevě byl proveden *in vitro* fermentační systém, využívající stolice od čtyř různých dárců jako inokulum. Fermentace probíhala za daných podmínek. Vzorky stolice s kyselinou ferulovou k měření na NMR byly odebírané v časových intervalech 0 h, 2 h, 4 h, 8 h a 24 h. Zároveň bylo provedeno měření kontroly (pouze inokulum) a pozitivní kontroly (pouze kyselina ferulová bez inokula). Pomocí programu Chenomx byl sledován rozklad kyseliny ferulové v čase a dále byl sledován vznik metabolitů katabolismem kyseliny ferulové a působením střevní mikrobioty. V analyzovaných vzorcích bylo identifikováno několik látek, které můžeme vidět na obrázku 11. Jsou to 3-fenylpropionová kyselina, 3,4-dihydroxyhydroskořicová kyselina, 3-hydroxyfenyloctová kyselina, hydroferulová kyselina, hydroisoferulová, ferulát a fenol.

Produkcí fenolu je možné vidět u všech 4 dárců (obrázek 12). U dárců 1 až 3 vznikl po 8 h, u dárce 4 až po 24 h a v daleko menším množství. Nepožavujeme jej ovšem za jeden z hlavních metabolitů kyseliny ferulové, protože přesně nedokážeme určit, zda vznikl fermentací kyseliny ferulové nebo z jiného substrátu, například fermentací nestrávených proteinů. Pokud bychom měli více dárců a případně znali jejich stravovací návyky, bylo by možné určit, zda můžeme fenol považovat jako význaný metabolit kyseliny ferulové.

U tří dárců byla identifikována také kyselina hydroisoferulová, redukováná forma kyseliny isoferulové. Kyselina isoferulová, izomer kyseliny ferulové, se v rostlinách vyskytuje jen vzácně a předpokládá se, že stejně jako kyselina ferulová vykazuje antioxidační aktivitu (Wang, Li, & Chen 2011). Hydroisoferulová kyselina je izomer hydroferulové kyseliny, předpokládáme proto, že se ve vzorcích nevyskytuje, jedná se spíše o záměnu s hydroferulovou kyselinou, která je hlavním metabolitem kyseliny ferulové. Vývoj její koncentrace je vidět na obrázku 12 a 14. Dle Zhao a Moghadasian 2008, patří mezi hlavní metabolity kyseliny ferulové hydroferulová kyselina, 3-fenylpropionová kyselina a 3,4-dihydroxyhydroskořicová kyselina. Jako další potencionální metabolit jsme identifikovali 3-hydroxyfenyloctovou kyselinu. Koncentrace jednotlivých metabolitů u jednotlivých dárců (1 až 4) a v jednotlivých časech (0 h, 2 h, 4 h, 8 h a 24 h) jsou uvedeny v tabulce 3. Na obrázku 12 pak vidíme trendy růstu a případného poklesu koncentrace hlavních metabolitů kyseliny ferulové u všech dárců v závislosti na čase.



**Obrázek 11** Histogram identifikovaných metabolitů kyseliny ferulové u dárců 1 až 4 v čase 0 h až 24 h



**Obrázek 12** Vývoj koncentrace metabolitů kyseliny ferulové u dárců jednotlivých v čase 0 h až 24 h

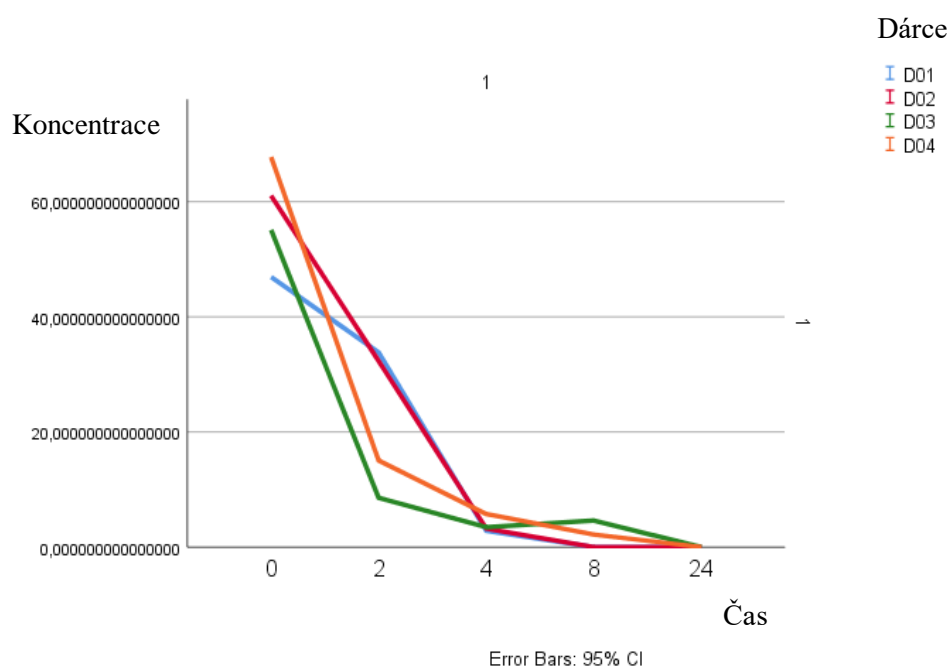
**Tabulka 3** Koncentrace metabolitů kyseliny ferulové ve stolici dárců 1-4, v čase 0 h - 24 h v mg/dl

<b>Dárce</b>	<b>Čas (h)</b>	<b>Ferulát (mg/dl)</b>	<b>Hydroferulová kyselina (mg/dl)</b>	<b>3,4-dihydroxyhydroskořicová kyselina (mg/dl)</b>	<b>3-hydroxyfenyloctová kyselina (mg/dl)</b>	<b>3-fenylpropionová kyselina (mg/dl)</b>	<b>Fenol (mg/dl)</b>
<b>D01</b>	00	46,92	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>D02</b>	00	61,06	0,00	0,00	0,00	9,58	0,00
<b>D03</b>	00	55,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>D04</b>	00	67,75	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>D01</b>	02	33,82	0,00	0,00	0,00	1,59	0,00
<b>D02</b>	02	32,32	18,59	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>D03</b>	02	8,56	31,18	4,34	1,98	4,87	0,00
<b>D04</b>	02	15,04	30,81	4,91	1,46	0,00	0,00
<b>D01</b>	04	2,83	46,33	12,03	2,45	7,46	0,00
<b>D02</b>	04	3,23	42,39	1,63	2,86	5,81	0,00
<b>D03</b>	04	3,46	24,10	22,53	5,71	9,07	0,00
<b>D04</b>	04	5,75	39,08	1,87	3,05	8,51	0,00
<b>D01</b>	08	0,00	31,38	8,17	0,79	4,10	8,99
<b>D02</b>	08	0,00	36,30	7,41	1,09	6,63	26,15
<b>D03</b>	08	4,62	0,00	2,24	3,01	4,13	4,01
<b>D04</b>	08	2,19	10,95	13,31	2,73	32,80	0,00
<b>D01</b>	24	0,00	0,00	9,18	0,57	20,65	20,48
<b>D02</b>	24	0,00	4,05	35,62	0,46	4,30	25,57
<b>D03</b>	24	0,00	0,00	6,98	5,69	0,00	22,07
<b>D04</b>	24	0,00	0,00	4,17	4,54	60,10	5,79

## 8.1 Ferulát

Hlavní sledovanou látkou ve vzorcích byl ferulát a jeho katabolismus. V čase 0 h bylo množství u všech dárců v rozmezí 46 mg/dl - 67 mg/dl. V čase 2 h množství viditelně kleslo, u dárce 1 z 46,92 mg/dl na 33,82 mg/dl, u dárce 2 téměř o polovinu z hodnoty 61,06 mg/dl na 32,32 mg/dl, stejně jako u dárce 4, kdy koncentrace klesla z 67,75 mg/dl na 15,04 mg/dl. U dárce 3 došlo k nejrychlejšímu rozkladu z hodnoty 55,09 mg/dl na 8,56 mg/dl. V čase 4 h hodnoty koncentrací opět viditelně klesly, u dárce 1 na 2,83 mg/dl, u dárce 2 na 3,23 mg/dl, u dárce 3 na 3,46 mg/dl a u dárce 4 na 5,75 mg/dl. Po 8 h byl ferulát kompletně katabolizován u dárců 1 a 2, u dárce 4 byla koncentrace 2,19 mg/dl. Je zajímavé že u dárce 3 koncentrace stoupla na 4,62 mg/dl. U tohoto výsledku je pravděpodobné, že došlo ke špatné kvantifikaci při vyhodnocování v programu Chenomx. Po 24 h je z tabulky 3 patrné, že u všech dárců došlo ke kompletnímu katabolismu ferulátu. Na obrázku 13 můžeme vidět grafické zpracování klesajících koncentrací ferulátu v čase.

Kyselina ferulová je v lidském trávicím traktu štěpena feruloylesterázami, které produkují bakterie přítomné ve střevech, typicky *Lactobacillus acidophilus*. Aktivita feruloylesteráz je pak často silně indukována hemicelulóзовými látkami, přičemž nejvyšší aktivita byla detekována, když byly jako zdroj uhlíku použity pšeničné otruby. Se zvyšujícími se hladinami volné kyseliny ferulové se produkce feruloylesteráz zvyšuje (Xiaokun Wang et al 2005). Nedávné studie také ukázaly, že střevní mikrobiota ovlivňuje tvorbu kyseliny ferulové, zatímco samotná kyselina ferulová může nepřímo modulovat střevní mikrobiotu. Střevní mikrobiota hraje důležitou roli v regulaci zdraví a různých nemocí. Změna složení střevní mikrobioty pak pravděpodobně může ovlivnit prognózu a vývoj nemocí, například kardiovaskulárních onemocnění (Liu et al. 2019).

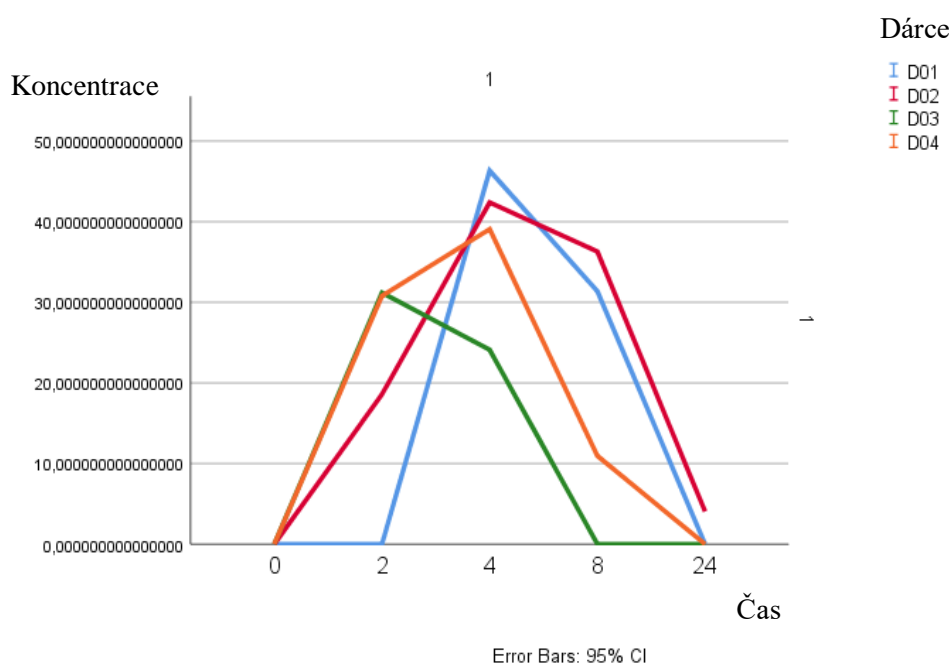


**Obrázek 13** Vývoj koncentrace ferulátu dárců 1 až 4 v čase 0 h až 24 h

## 8.2 Kyselina hydroferulová

Hlavním metabolitem kyseliny ferulové je kyselina hydroferulová. V tabulce 3 vidíme výsledné koncentrace. V čase 0 h je u všech dárců koncentrace 0 mg/dl. V čase 2 h je koncentrace 0 mg/dl pouze u dárce 1, u dalších dárců již probíhal katabolismus a začaly vznikat metabolity. U dárce 2 byla koncentrace 18,59 mg/dl, u dárce 3 31,18 mg/dl, u dárce 4 30,81 mg/dl. V čase 4 h byla koncentrace hydroferulové kyseliny u 3 dárců nejvyšší z celého průběhu fermentace, pouze u dárce 3 byla nižší než v čase 2 h. U dárce 1 byla 46,33 mg/dl, u dárce 2 42,39 mg/dl, u dárce 3 24,10 mg/dl a u dárce 4 39,08 mg/dl. V čase 8 h koncentrace začala klesat, předpokládáme tedy, že se kyselina hydroferulová metabolizovala na další sloučeniny. U dárce 1 byla koncentrace 31,38 mg/dl, u dárce 2 36,30 mg/dl, u dárce 3 již byla plně matabolizovaná a koncentrace byla 0 mg/dl, u dárce 4 10,95 mg/dl. V čase 24 h byla u 3 dárců kyselina hydroferulová plně metabolizovaná, koncentrace byla tedy 0 mg/dl, pouze u dárce 3 nedošlo k plné metabolizaci a koncentrace byla 4,05 mg/dl. Na obrázku 14 můžeme vidět grafické zpracování koncentrací kyseliny hydroferulové v čase.

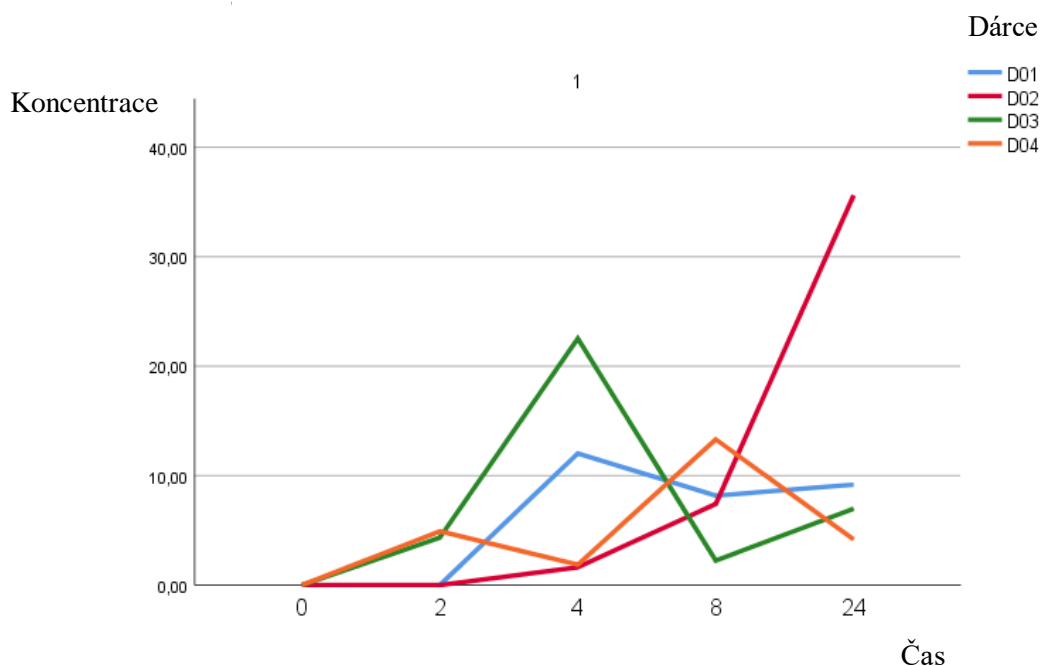
Jakmile je kyselina ferulová uvolněna střevní mikrobiotou z buněčné stěny, může být dále metabolizována hydrogenací na p-nenasycené vazby, demetylací a selektivní dehydroxylací na C4 za vzniku dalších fenolových metabolitů. Další redukce dvojnás vazby kyseliny ferulové dává vzniknout kyselině hydroferulové, která pokud vstoupí do cyklu  $\beta$ -oxidace, může produkovat kyselinu vanilovou (Rechner et al. 2001). Kyselina hydroferulová je metabolitem kyseliny ferulové, jejím metabolickým původem mohou být ovšem estery kyseliny feruloyl chinové a nebo estery kyseliny caffeoyl chinové přítomné v kávě. Kyselina ferulová a hydroferulová mohou být tedy považovány za specifické biomarkery biologické dostupnosti a metabolismu esterů kyseliny kávové v potravě.



**Obrázek 14** Vývoj koncentrace kyseliny hydroferulové dárců 1 až 4 v čase 0 h až 24 h

### 8.3 Kyselina 3,4-dihydroxyhydroskořicová

Dalším identifikovaným metabolitem byla 3,4-dihydroxyhydroskořicová kyselina. V čase 0 h u žádného z dárců nevznikala. V čase 2 h v menším množství vznikla u dárce 3 o koncentraci 4,34 mg/dl a u dárce 4 o koncentraci 4,91 mg/dl. U dárců 1 a 2 byla koncentrace 0 mg/dl. V čase 4 h byla vytvořena již u všech dárců, u dárců 2 a 4 byla koncentrace viditelně menší než u dárců 1 a 3. U dárce 1 byla koncentrace 12,03 mg/dl, u dárce 2 1,63 mg/dl, u dárce 3 22,53 mg/dl a u dárce 4 1,87 mg/dl. V čase 8 h u dárců 1 a 3 koncentrace 3,4-dihydroxyhydroskořicové kyseliny oproti času 4 h klesla, u dárce 1 na 8,17 mg/dl, u dárce 3 na 2,24 mg/dl. U dárců 2 a 4 naopak vzrostla, u dárce 2 byla 7,41 mg/dl, u dárce 4 13,31 mg/dl. V čase 24 h potom koncentrace opět vzrostla u dárce 1, 9,18 mg/dl, u dárce 2, 35,62 mg/dl, u dárce 3, 6,98 mg/dl. Naopak u dárce 4 koncentrace klesla na 4,17 mg/dl. Na obrázku 15 můžeme vidět grafické zpracování koncentrací 3,4-dihydroxyhydroskořicové kyseliny v čase jednotlivých dárců. Na obrázku vidíme, že pouze u dárce 2 koncentrace v čase postupně roste, u ostatních dárců roste, poté klesne a pak opět roste či klesá. Je otázkou, zda za těmito výsledky stojí chyba v kvantifikaci při vyhodnocování spekter nebo je tyto změny možné vysvětlit rozdílným složením střevní mikrobioty jednotlivých dárců.

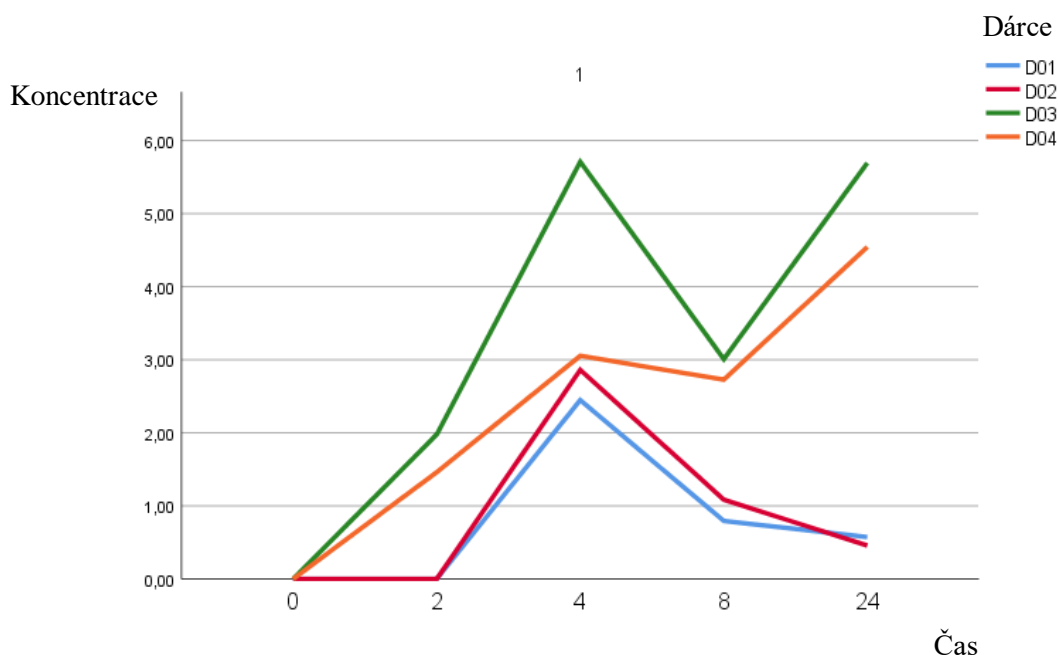


**Obrázek 15** Vývoj koncentrace kyseliny 3,4-dihydroxyhydroskořicové dárců 1 až 4 v čase 0 h až 24 h

## 8.4 Kyselina 3-hydroxyfenyloctová

Dalším sledovaným metabolitem je kyselina 3-hydroxyfenyloctová. V čase 0 h nevznikala ani u jednoho dárce. V čase 2 h vznikla v mením množství u dárců 3 a 4. Koncentrace u dárce 3 byla 1,98 mg/dl, u dárce 4 pak 1,46 mg/dl. V čase 4 h vznikala kyselina 3-hydroxyfenyloctová u všech čtyř dárců a u všech dárců byla její koncentrace nejvyšší, jak vidíme z tabulky 3 a také na obrázku 16. U dárce 1 byla koncentrace 2,45 mg/dl, u dárce 2 2,86 mg/dl, u dárce 3 5,71 mg/dl a u dárce 4 3,05 mg/dl. V čase 8 h u všech dárců koncentrace kyseliny klesla. U dárce 1 na 0,79 mg/dl, u dárce 2 na 1,09 mg/dl, u dárce 3 na 3,01 mg/dl a u dárce 4 na 2,73 mg/dl. V čase 24 h koncentrace klesla u dárců 1 a 2 na 0,57 mg/dl a 0,46 mg/dl. Naopak u dárců 3 a 4 vzrostla a to na 5,69 mg/dl a 4,54 mg/dl.

Polyfenoly jsou biotransformovány střevní mikrobiotou, nejprve deglykosylací, následovanou rozpadem flavonoidů na relativně jednoduché aromatické karboxylové kyseliny, běžně označované jako fenolové kyseliny (Parkar, Trower, & Stevenson 2013). Kyselina 3-hydroxyfenyloctová může tedy vznikat nejen z kyseliny ferulové, ale také rozpadem flavonoidů, jako je třeba rutinu, kdy v plazmě byla tato kyselina detekována po 4 hodinách a maximální koncentrace byla detekována mezi 8 až 12 hodinami (Aura et al., 2002)

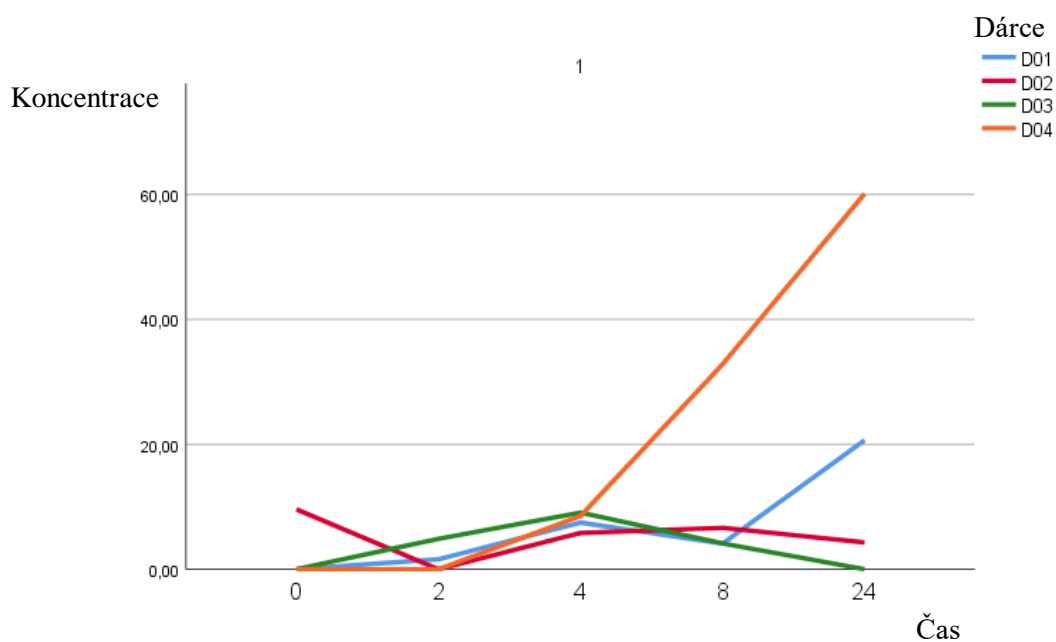


**Obrázek 16** Vývoj koncentrace kyseliny 3-hydroxyfenyloctové dárců 1 až 4 v čase 0 h až 24 h

## 8.5 Kyselina 3-fenylpropionová

Posledním měřeným metabolitem byla kyselina 3-fenylpropionová. V čase 0 h byla detekována pouze u dárce 1 v koncentraci 9,58 mg/dl. Je možné že tato hodnota byla chybně detekována, protože v čase 2 h je koncentrace 0 mg/dl. V čase 2 h je u dárce 1 koncentrace 1,59 mg/dl, u dárce 3 4,87 mg/dl, u dárce 2 a 4 je to 0 mg/dl. V čase 4 h koncentrace u všech dárce vzrostla. U dárce 1 na 7,46 mg/dl, u dárce 2 na 5,81 mg/dl, u dárce 3 na 9,07 mg/dl a u dárce 4 na 8,51 mg/dl. V čase 8 h byla koncentrace u dárce 1 a 3 nižší a to 4,10 mg/dl a 4,13 mg/dl. U dárce 2 a 4 byla 6,63 mg/dl a 32,80 mg/dl. V čase 24 h byla koncentrace u dárce 1 20,65 mg/dl, což je téměř 5x více než v čase 8 h. U dárce 2 byla 4,30 mg/dl, u dárce 3 pak klesla na 0 mg/dl a u dárce 4 vzrostla na 60,10 mg/dl. Na obrázku 17 můžeme vidět, že pouze u dárce 4 koncentrace kyseliny 3-fenylpropionové v čase rostla.

Hlavní metabolické cesty kyseliny ferulové jsou redukce, demetylace a dehydroxylace na C4. Dehydroxylace na C3 se vyskytuje jen zřídka. Výsledným produktem dehydroxylace je pak kyselina 3-fenylpropionová. Ta, stejně jako kyselina 3-hydroxyfenylacetová, může vznikat jak z kyseliny ferulové, tak i z dalších polyfenolů, například flavanonu hesperidinu. Metabolismem hesperidinu vznikne v tlustém střevě kyselina 3,4-dihydroxyfenylpropionová, která se dále dehydroxyluje na 3-hydroxyfenylpropionovou kyselinu (Aura et al., 2002). Průchodem do tkání pak může docházet ke zkrácení postranního řetězce a vzniku kyseliny 3-hydroxybenzoové.



**Obrázek 17** Vývoj koncentrace kyseliny 3-fenylpropionové dárce 1 až 4 v čase 0 h až 24



Kromě analýzy vzorků kyseliny ferulové s inokulem, bylo také provedeno měření kontroly, což byly pouze vzorky inokula a měření pozitivní kontroly, což byly vzorky, obsahující pouze kyselinu ferulovou bez inokula. U pozitivní kontroly byla sledována koncentrace kyseliny ferulové opět v časech 0 h, 4 h, 8 h a 24. Koncentrace jsou uvedeny v grafu v příloze č. 3. Pomocí programu Statistica byla provedena analýza rozptylu, viz příloha č.4, kde nebyl zaznamenán žádný statisticky významný rozdíl. Jelikož se jednalo o pozitivní kontrolu, kdy na kyselinu ferulovou nepůsobila střevní mikrobiota, předpokladem bylo, že koncentrace se v čase nebude měnit, případně bude lehce klesat díky možnému samovolnému rozpadu kyseliny.

Bakterie v gastrointestinálním traktu ovlivňují lidského hostitele mnoha způsoby. Mezi jejich činnosti patří fermentace potravy, které projde neztrávená tenkým střevem, produkce mastných kyselin s krátkým řetězcem (octan, propionát, butyrát) a produkce plynů H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> a CH<sub>4</sub>. Dále také modulace imunitního systému, transformace žlučových kyselin, tvorba vitamínů a dalších biologicky významných látek. Střevní mikrobiota má však také potenciál tvořit toxické, karcinogeny či mutageny látky (Blaut, Schoefer, & Braune 2003).

Mnoho polyfenolů, navzdory jejich přijímanému množství v rostlinné stravě, není biologicky dostupných. Během trávení jsou špatně vstřebávány, protože podléhají rozsáhlému metabolismu trávicími enzymy a střevní mikrobiotou. Odhaduje se, že 90 až 95 % polyfenolů ze stravy se v tenkém střevě neabsorbují, a proto se hromadí ve střevě tlustém. Mezi tyto polyfenoly patří oligomerní a polymerní proanthokyanidiny, polyfenoly glykosylované rhamnózou, estery kyseliny hydroxyskořicové (kyselina chlorogenová, kyselina kávová, kyselina ferulová) a lignany. V tlustém střevě jsou metabolizovány střevní mikrobiotou a vytvářejí řadu jednodušších, lépe vstřebatelných sloučenin. Stupeň degradace polyfenolů ovlivňuje nejen koncentrace substrátu, ale i individuální změny ve složení střevní mikrobioty. Vzniklé jednoduché fenolové sloučeniny mohou být považovány za biomarkery metabolismu tlustého střeva. Metabolismus polyfenolů v tlustém střevě obecně zahrnuje biotransformaci na jednoduché fenoly, fenolové kyseliny, aromatické látky a laktony s různým stupněm hydroxylace a délky postranního řetězce. Působením mikrobioty mohou být polyfenolové metabolity absorbovány do enterocytů pasivní difúzí a vstoupit tak do jater, kde jsou dále metabolizovány enzymy před dalším vstupem do oběhu nebo vyloučením močí. Neabsorbované polyfenolové metabolity jsou vylučovány stolicí (Sánchez-Patán et al. 2011), (Sadeghi Ekbatan et al. 2016).

Složení metabolitů závisí tedy na různých faktorech, jako je například zdravotní stav nebo strava hostitele a také může záviset i na počtu a rozmanitosti mikrobiálních druhů v trávicím traktu.

## 9 Závěr

Cílem této práce bylo ukázat možnosti NMR spektroskopie při sledování katabolismu polyfenolů v *in vitro* modelu tlustého střeva. Pro tuto práci byl ze široké škály rostlinných polyfenolů vybrán jeden zástupce a to kyselina ferulová. Byla stanovena hypotéza, že kyselina ferulová je ve střevech rozkládána za vzniku metabolitů a že pomocí NMR je možno sledovat jak tento rozklad, tak i vznik potencionálních metabolitů. Pomocí knihovny Chenomx pak byly tyto látky kvantifikovány.

Byly zjištěny rozdíly ve schopnostech mikrobioty tlustého střeva metabolizovat, což naznačuje, že u každého jedince mohou vznikat jiné metabolity v jiné koncentraci a poměru. To poté může vést i k jiným biologickým účinkům vzniklých metabolitů. Variabilita ve výsledcích mezi jednotlivými dárci může být tedy obecně vysvětlena jednak rozdílným složením střevní mikrobioty jednotlivých dárců, tak také strukturou testované látky a schopností této látky odolávat mikrobiálnímu rozkladu.

NMR je jednou z nejvíce efektivních, robustních a dobře reprodukovatelných analytických metod k získávání metabolických profilů v biologických vzorcích a to bez nutnosti rozsáhlých a zdlouhavých příprav vzorků. V kombinaci s další analytickou metodou a s vhodnou analýzou představuje tato technika dobrou možnost zkoumání metabolismu a možné diagnostiky či prognózy různých onemocnění. V současné době je NMR využíváno ke sledování metabolitů z krve či moči, sledování metabolitů ze vzorků stolice je teprve na vzestupu. V posledních letech bylo díky analytickým metodám dosaženo významného pokroku v porozumění strukturálních změn, ke kterým dochází při vstřebávání flavonoidů i neflavonoidních látek. Postupně také dochází k objasňování faktorů, které ovlivňují vstřebávání a míru metabolizace polyfenolů v gastrointestinálním traktu.

## 10 Literatura

- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., & Tattini, M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science*, *196*, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.07.014>
- Agati, G., & Tattini, M. (2010). Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. *New Phytologist*, *186*(4), 786–793. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03269.x>
- Ajila, C. M., Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., Godbout, S., & Valéro, J. R. (2011). Extraction and Analysis of Polyphenols: Recent trends. *Critical Reviews in Biotechnology*, *31*(3), 227–249. <https://doi.org/10.3109/07388551.2010.513677>
- Aura, A. M., O’Leary, K. A., Williamson, G., Ojala, M., Bailey, M., Puupponen-Pimiä, R., ... Poutanen, K. (2002). Quercetin derivatives are deconjugated and converted to hydroxyphenylacetic acids but not methylated by human fecal flora in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(6), 1725–1730. <https://doi.org/10.1021/jf0108056>
- Aviram, M., Dornfeld, L., Rosenblat, M., Volkova, N., Kaplan, M., Coleman, R., ... Fuhrman, B. (2000). Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *71*(5), 1062–1076. <https://doi.org/10.1093/ajcn/71.5.1062>
- Balasubashini, M. S., Rukkumani, R., Viswanathan, P., & Menon, V. P. (2004). Ferulic acid alleviates lipid peroxidation in diabetic rats. *Phytotherapy Research*, *18*(4), 310–314. <https://doi.org/10.1002/ptr.1440>
- Beecher, G. R. (1998). Nutrient Content of Tomatoes and Tomato Products. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, *218*(2), 98–100. <https://doi.org/10.3181/00379727-218-44282a>
- Belobrajdic, D. P., & Bird, A. R. (2013). Belobrajdic & Bird 2013). *Nutrition Journal*, *12*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-12-62>
- Bharti, S. K., & Roy, R. (2012). Quantitative <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *35*, 5–26. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2012.02.007>
- Blaut, M., Schoefer, L., & Braune, A. (2003). Transformation of flavonoids by intestinal microorganisms. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, *73*(2), 79–87. <https://doi.org/10.1024/0300-9831.73.2.79>
- Bourne, L. C., & Rice-Evans, C. (1998). Bioavailability of ferulic acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *253*(2), 222–227. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9681>
- Bunzel, M., Ralph, J., Marita, J. M., Hatfield, R. D., & Steinhart, H. (2001). Diferulates as structural components in soluble and insoluble cereal dietary fibre. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *81*(7), 653–660. <https://doi.org/10.1002/jsfa.861>
- Cassidy-Aedin, a, H.-B., & Rosa-M, L.-R. (2000). Isoflavones, lignans and stilbenes - Origins, metabolism and potential importance to human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *80* (7)(December 1999), 1044-1062.
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. de L., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., & Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, *113*(4), 859–871. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.001>

- Chong, J., Poutaraud, A., & Huguency, P. (2009). Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Science*, *177*(3), 143–155. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.05.012>
- Chung, M. I., Teng, C. M., Cheng, K. L., Ko, F. N., & Lin, C. N. (1992). An antiplatelet principle of *Veratrum formosanum*. *Planta Medica*, *58*(3), 274–276. <https://doi.org/10.1055/s-2006-961453>
- Cook, N. C., & Samman, S. (1996). Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *7*(2), 66–76. [https://doi.org/10.1016/0955-2863\(95\)00168-9](https://doi.org/10.1016/0955-2863(95)00168-9)
- Couteau, D., McCartney, A. L., Gibson, G. R., & Williamson, G. (2001). Isolation and characterization of human colonic bacteria able to hydrolyse chlorogenic acid. *Journal of Applied Microbiology*, *90*(6), 873–881. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01316.x>
- Crozier, A., & Clifford, M. N. (2006). *Terpenes, Plant Secondary Metabolites. Plant Secondary Metabolites Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. <https://doi.org/10.1002/anie.200685491>
- Dixon, R. A., & Paiva, N. L. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, *7*(7), 1085–1097. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.7.1085>
- Drahansky, M., Paridah, M. ., Moradbak, A., Mohamed, A. ., Owolabi, F. abdulwahab taiwo, Asniza, M., & Abdul Khalid, S. H. . (2016). We are IntechOpen, the world's leading publisher of Open Access books Built by scientists, for scientists TOP 1%. *Intech, i(tourism)*, *13*. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/57353>
- Duffy, S. J., Jr, J. F. K., Holbrook, M., Gokce, N., Swerdloff, P. L., Frei, B., & Vita, J. A. (2001). Short- and Long-Term Black Tea Consumption Reverses Endothelial Dysfunction in Patients With Coronary Artery Disease. *Circulation*, *104*(2), 151–156. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.104.2.151>
- El Gharras, H. (2009). Polyphenols: Food sources, properties and applications - A review. *International Journal of Food Science and Technology*, *44*(12), 2512–2518. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02077.x>
- Fraga, C. G., Galleano, M., Verstraeten, S. V, & Oteiza, P. I. (2010). Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Molecular Aspects of Medicine*, *31*(6), 435–445. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mam.2010.09.006>
- García-Lafuente, A., Guillamón, E., Villares, A., Rostagno, M. A., & Martínez, J. A. (2009). Flavonoids as anti-inflammatory agents: Implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflammation Research*, *58*(9), 537–552. <https://doi.org/10.1007/s00011-009-0037-3>
- Ghasemzadeh, A., & Ghasemzadeh, N. (2011). Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plant Research*, *5*(31), 6697–6703. <https://doi.org/10.5897/JMPR11.1404>
- Graf, E. (1992). Antioxidant potential of ferulic acid. *Free Radical Biology and Medicine*, *13*(4), 435–448. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(92\)90184-I](https://doi.org/10.1016/0891-5849(92)90184-I)
- Gunnaiah, R., Kushalappa, A. C., Duggavathi, R., Fox, S., & Somers, D. J. (2012). Integrated metabolo-proteomic approach to decipher the mechanisms by which wheat qtl (Fhb1) contributes to resistance against *Fusarium graminearum*. *PLoS ONE*, *7*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040695>

- Hamans, B. C., Andreychenko, A., Heerschap, A., Wijmenga, S. S., & Tessari, M. (2011). NMR at earth's magnetic field using para-hydrogen induced polarization. *Journal of Magnetic Resonance*, 212(1), 224–228. <https://doi.org/10.1016/J.JMR.2011.06.011>
- Huang, Z., Dostal, L., & Rosazza, J. P. N. (1993). Mechanisms of ferulic acid conversions to vanillic acid and guaiacol by *Rhodotorula rubra*. *Journal of Biological Chemistry*, 268(32), 23954–23958.
- Johnson, I. T., Williamson, G., & Musk, S. R. R. (1994). Anticarcinogenic Factors in Plant Foods: A New Class of Nutrients? *Nutrition Research Reviews*, 7(1), 175–204. <https://doi.org/10.1079/nrr19940011>
- Kayahara, H., Miao, Z., & Fujiwara, G. (1999). Synthesis and biological activities of ferulic acid derivatives. *Anticancer Research*, 19(5A), 3763–3768. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/10625955>
- Kim, H. K., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2010). NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nature Protocols*, 5(3), 536–549. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.237>
- Konishi, Y., & Shimizu, M. (2003). Transepithelial Transport of Ferulic Acid by Monocarboxylic Acid Transporter in Caco-2 Cell Monolayers. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 67(4), 856–862. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.856>
- Kumar, N., & Pruthi, V. (2014). Potential applications of ferulic acid from natural sources. *Biotechnology Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2014.09.002>
- Kushwaha, R., & Karanjekar, S. (2011). Standardization of ashwagandharishta formulation by TLC method. *International Journal of ChemTech Research*, 3(3), 1033–1036. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.026>
- Lafay, S., Morand, C., Manach, C., Besson, C., & Scalbert, A. (2006). Absorption and metabolism of caffeic acid and chlorogenic acid in the small intestine of rats. *British Journal of Nutrition*, 96(1), 39–46. <https://doi.org/10.1079/bjn20061714>
- Liu, Z., Ma, Z., Zhang, H., Summah, B. S., Liu, H., An, D., ... Xu, D. (2019). Ferulic acid increases intestinal *Lactobacillus* and improves cardiac function in TAC mice. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 120(July), 109482. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109482>
- Maeda, K., Kuzuya, M., Cheng, X. W., Asai, T., Kanda, S., Tamaya-Mori, N., ... Iguchi, A. (2003). Green tea catechins inhibit the cultured smooth muscle cell invasion through the basement barrier. *Atherosclerosis*, 166(1), 23–30. [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(02\)00302-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(02)00302-7)
- Manach C, Scalbert A, Morand C, et al. (2004). Bioavailability, Polyphenols: Food sources and. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727–747. <https://doi.org/10.1038/nature05488>
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1 Suppl), 230–242. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.230s>
- Manuscript, A., Society, R., Manuscripts, A., Manuscript, T. A., Manuscripts, A., Society, R., & Manuscript, A. (n.d.). RSC Advances.
- Marcone, M. F., Wang, S., Albabish, W., Nie, S., Somnarain, D., & Hill, A. (2013). Diverse food-based applications of nuclear magnetic resonance (NMR) technology. *Food*

- Research International*, 51(2), 729–747.  
<https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2012.12.046>
- Mathew, S., & Abraham, T. E. (2006). Bioconversions of ferulic acid, an hydroxycinnamic acid. *Critical Reviews in Microbiology*, 32(3), 115–125.  
<https://doi.org/10.1080/10408410600709628>
- Moosmang, S., Pitscheider, M., Sturm, S., Seger, C., Tilg, H., Halabalaki, M., & Stuppner, H. (2019). Metabolomic analysis—Addressing NMR and LC-MS related problems in human feces sample preparation. *Clinica Chimica Acta*, 489(October), 169–176.  
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.10.029>
- Munro, I. C., Harwood, M., Hlywka, J. J., Stephen, A. M., Doull, J., Flamm, W. G., & Adlercreutz, H. (2003). Soy isoflavones: A safety review. *Nutrition Reviews*, 61(1), 1–33. <https://doi.org/10.1301/nr.2003.janr.1-33>
- Ohtsuki, T., Sato, K., Sugimoto, N., Akiyama, H., & Kawamura, Y. (2012). Absolute quantification for benzoic acid in processed foods using quantitative proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Talanta*, 99, 342–348.  
<https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2012.05.062>
- Orrenius, S., Gogvadze, V., & Zhivotovsky, B. (2007). Mitochondrial Oxidative Stress: Implications for Cell Death. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47(1), 143–183. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105122>
- Ou, L., Kong, L. Y., Zhang, X. M., & Niwa, M. (2003). Oxidation of ferulic acid by *Momordica charantia* peroxidase and related anti-inflammation activity changes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26(11), 1511–1516.  
<https://doi.org/10.1248/bpb.26.1511>
- Pandey, K., & Rizv, S. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), 270–278.
- Parkar, S. G., Trower, T. M., & Stevenson, D. E. (2013). Fecal microbial metabolism of polyphenols and its effects on human gut microbiota. *Anaerobe*, 23, 12–19.  
<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.07.009>
- Pelantová, H. Aplikace NMR spektroskopie v metabolomice. Olomouc, 2015. disertační práce (Ph.D.). UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI. Přírodovědecká fakulta
- Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7), 1035–1042. <https://doi.org/10.1021/np9904509>
- Pirola, L., & Fröjdö, S. (2008). Resveratrol: One molecule, many targets. *IUBMB Life*, 60(5), 323–332. <https://doi.org/10.1002/iub.47>
- Poquet, L., Clifford, M. N., & Williamson, G. (2008). Transport and metabolism of ferulic acid through the colonic epithelium. *Drug Metabolism and Disposition*, 36(1), 190–197.  
<https://doi.org/10.1124/dmd.107.017558>
- Pugatch, T., & Schroeder, E. (2018). *Teacher pay and student performance: evidence from the Gambian hardship allowance*. *Journal of Development Effectiveness* (Vol. 10).  
<https://doi.org/10.1080/19439342.2018.1452778>
- Ramawat, K. G., & Mérillon, J. M. (2013). *Natural products: Phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes*. *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*.  
<https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6>

- Rechner, A. R., Spencer, J. P. E., Kuhnle, G., Hahn, U., & Rice-Evans, C. A. (2001). Novel biomarkers of the metabolism of caffeic acid derivatives in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*, *30*(11), 1213–1222. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00506-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00506-8)
- Renema, W. K. J., Kan, H. E., Wieringa, B., & Heerschap, A. (2007). In vivo magnetic resonance spectroscopy of transgenic mouse models with altered high-energy phosphoryl transfer metabolism. *NMR in Biomedicine*, *20*(4), 448–467. <https://doi.org/10.1002/nbm>
- Reviews, C. (2010). Extraction and Analysis of Polyphenols : Recent trends Extraction and Analysis of Polyphenols : Recent trends, (February 2015). <https://doi.org/10.3109/07388551.2010.513677>
- Robbins, R. J. (2003). Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(10), 2866–2887. <https://doi.org/10.1021/jf026182t>
- Rosazza, J. P. N., Huang, Z., Dostal, L., Volm, T., & Rousseau, B. (1995). Biocatalytic transformations of ferulic acid: An abundant aromatic natural product. *Journal of Industrial Microbiology*, *15*(6), 472–479. <https://doi.org/10.1007/BF01570017>
- Sadeghi Ekbatan, S., Sleno, L., Sabally, K., Khairallah, J., Azadi, B., Rodes, L., ... Kubow, S. (2016). Biotransformation of polyphenols in a dynamic multistage gastrointestinal model. *Food Chemistry*, *204*, 453–462. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.140>
- Sánchez-Patán, F., Monagas, M., Moreno-Arribas, M. V., & Bartolomé, B. (2011). Determination of microbial phenolic acids in human faeces by UPLC-ESI-TQ MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(6), 2241–2247. <https://doi.org/10.1021/jf104574z>
- Savorani, F., Rasmussen, M. A., Mikkelsen, M. S., & Engelsen, S. B. (2013). A primer to nutritional metabolomics by NMR spectroscopy and chemometrics. *Food Research International*, *54*(1), 1131–1145. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2012.12.025>
- Serkova, N. J., & Brown, M. S. (2012). Quantitative analysis in magnetic resonance spectroscopy: from metabolic profiling to in vivo biomarkers. *Bioanalysis*, *4*(3), 321–341. <https://doi.org/10.4155/bio.11.320>
- Shafer, S. R., & Blum, U. (1991). Influence of Phenolic acids on microbial populations in the rhizosphere of cucumber. *Journal of Chemical Ecology*, *17*(2), 369–389. <https://doi.org/10.1007/BF00994339>
- Sharma, V., & Rao, L. J. M. (2009). A Thought on the Biological Activities of Black Tea. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *49*(5), 379–404. <https://doi.org/10.1080/10408390802068066>
- Silberberg, M., Morand, C., Mathevon, T., Besson, C., Manach, C., Scalbert, A., & Remesy, C. (2006). The bioavailability of polyphenols is highly governed by the capacity of the intestine and of the liver to secrete conjugated metabolites. *European Journal of Nutrition*, *45*(2), 88–96. <https://doi.org/10.1007/s00394-005-0568-5>
- Simmler, C., Napolitano, J. G., McAlpine, J. B., Chen, S. N., & Pauli, G. F. (2014). Universal quantitative NMR analysis of complex natural samples. *Current Opinion in Biotechnology*, *25*, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.08.004>
- Smolinska, A., Blanchet, L., Buydens, L. M. C., & Wijmenga, S. S. (2012). NMR and pattern recognition methods in metabolomics: From data acquisition to biomarker discovery: A review. *Analytica Chimica Acta*, *750*, 82–97. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.05.049>

- Sources, D., & Significance, N. (1998). Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance, *56*(11).
- Srinivasan, M., Sudheer, A. R., & Menon, V. P. (2007). Ferulic acid: Therapeutic potential through its antioxidant property. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, *40*(2), 92–100. <https://doi.org/10.3164/jcbtn.40.92>
- Stalikas, C. D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, *30*(18), 3268–3295. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700261>
- Taniguchi, H., Hosoda, A., Tsuno, T., Maruta, Y., & Nomura, E. (1999). Taniguchi H, Hosoda A, Tsuno T, Maruta Y and Nomura E, Preparation of ferulic acid and its application for the synthesis of cancer chemopreventive agents. *Anticancer Res* *19*:3757–3761. *Anticancer Research*, *19*(5A), 3757–3761. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/10625954>
- Tapas, A., Sakarkar, D., & Kakde, R. (2008). Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, *7*(3), 1089–1099. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v7i3.14693>
- Tapiero, H., D., K., & G. (2002). Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *56*(4 SRC-GoogleScholar), 200–207. Retrieved from [https://ac.els-cdn.com/S0753332202001786/1-s2.0-S0753332202001786-main.pdf?\\_tid=ab20040d-223e-4f71-a0fb-55d1928daf4a&acdnat=1546423697\\_961d37e16e9f7ed72230ff5137895af3](https://ac.els-cdn.com/S0753332202001786/1-s2.0-S0753332202001786-main.pdf?_tid=ab20040d-223e-4f71-a0fb-55d1928daf4a&acdnat=1546423697_961d37e16e9f7ed72230ff5137895af3)
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, *2*(12), 1231–1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>
- Usilová, J. I. M., & Latz, Z. D. E. N. Ě. K. G. (2011). *Metabolomika – základní pojmy, strategie a metodologie j*, 751.
- Verma, S., Singh, A., & Mishra, A. (2013). Gallic acid: Molecular rival of cancer. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *35*(3), 473–485. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.02.011>
- Vladimir-Kneevi, S., Blaekovi, B., Bival, M., & Babac, M. (2012). Plant Polyphenols as Antioxidants Influencing the Human Health. *Phytochemicals as Nutraceuticals - Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health*. <https://doi.org/10.5772/27843>
- Wang, Xiaokun, Geng, X., Egashira, Y., & Sanada, H. (2005). Release of ferulic acid from wheat bran by an inducible feruloyl esterase from an intestinal bacterium *Lactobacillus acidophilus*. *Food Science and Technology Research*, *11*(3), 241–247. <https://doi.org/10.3136/fstr.11.241>
- Wang, Xiaozhen, Li, X., & Chen, D. (2011). Evaluation of antioxidant activity of isoferulic acid in vitro. *Natural Product Communications*, *6*(9), 1285–1288. <https://doi.org/10.1177/1934578x1100600919>
- Zhang, A., Sun, H., Wang, P., Han, Y., & Wang, X. (2012). Recent and potential developments of biofluid analyses in metabolomics. *Journal of Proteomics*, *75*(4), 1079–1088. <https://doi.org/10.1016/J.JPROT.2011.10.027>
- Zhang, B., & Powers, R. (2012). Analysis of bacterial biofilms using NMR-based metabolomics. *Future Medicinal Chemistry*, *4*(10), 1273–1306. <https://doi.org/10.4155/fmc.12.59>



- Zhao, Z., Egashira, Y., & Sanada, H. (2003). Ferulic Acid Sugar Esters Are Recovered in Rat Plasma and Urine Mainly as the Sulfoglucuronide of Ferulic Acid. *The Journal of Nutrition*, *133*(5), 1355–1361. <https://doi.org/10.1093/jn/133.5.1355>
- Zhao, Z., & Moghadasian, M. H. (2008). Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. *Food Chemistry*, *109*(4), 691–702. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2008.02.039>
- Zhouen, Z., Side, Y., Weizhen, L., Wenfeng, W., Yizun, J., & Nianyun, L. (1998). Mechanism of reaction of nitrogen dioxide radical with hydroxycinnamic acid derivatives: A pulse radiolysis study. *Free Radical Research*, *29*(1), 13–16. <https://doi.org/10.1080/10715769800300021>

## 11 Seznam Obrázků a tabulek

Seznam Obrázku:

<b>Obrázek 1</b> Flavonové jádro.....	12
<b>Obrázek 2</b> Flavonol.....	13
<b>Obrázek 3</b> Základní struktura Flavonů.....	13
<b>Obrázek 4</b> Struktura flavan-3-olu.....	14
<b>Obrázek 5</b> Naringenin.....	14
<b>Obrázek 6</b> Struktura anthokyanidinu.....	15
<b>Obrázek 7</b> Základní struktura isoflavonů.....	15
<b>Obrázek 8</b> Kyselina gallová.....	17
<b>Obrázek 9</b> Resveratrol.....	17
<b>Obrázek 10</b> Kyselina ferulová.....	23
<b>Obrázek 11</b> Histogram identifikovaných metabolitů kyseliny ferulové u dárců 1 až 4 v čase 0 h až 24 h.....	34
<b>Obrázek 12</b> Vývoj koncentrace metabolitů kyseliny ferulové u dárců jednotlivých v čase 0 h až 24 h.....	34
<b>Obrázek 13</b> Vývoj koncentrace ferulátu dárců 1 až 4 v čase 0 h až 24 h.....	36
<b>Obrázek 14</b> Vývoj koncentrace kyseliny hydroferulové dárců 1 až 4 v čase 0 h až 24 h.....	37
<b>Obrázek 15</b> Vývoj koncentrace kyseliny 3,4-dihydroxyhydroskořicové dárců 1 až 4 v čase 0 h až 24 h.....	38
<b>Obrázek 16</b> Vývoj koncentrace kyseliny 3-hydroxyfenyloctové dárců 1 až 4 v čase 0 h až 24 h.....	39
<b>Obrázek 17</b> Vývoj koncentrace kyseliny 3-fenylpropionové dárců 1 až 4 v čase 0 h až 24 h.....	40

Seznam tabulek:

<b>Tabulka 1</b> Obsah kyseliny ferulové v ovoci a zelenině, upraveno dle Zhao a Moghadasian 2008.....	23
<b>Tabulka 2</b> Potřeba jednotlivých složek pro přípravu zásobních roztoků, dle protokolu.....	31
<b>Tabulka 3</b> Koncetrace metabolitů kyseliny ferulové ve stolici dárců 1-4, v čase 0 h-24 h v mg/dl.....	35

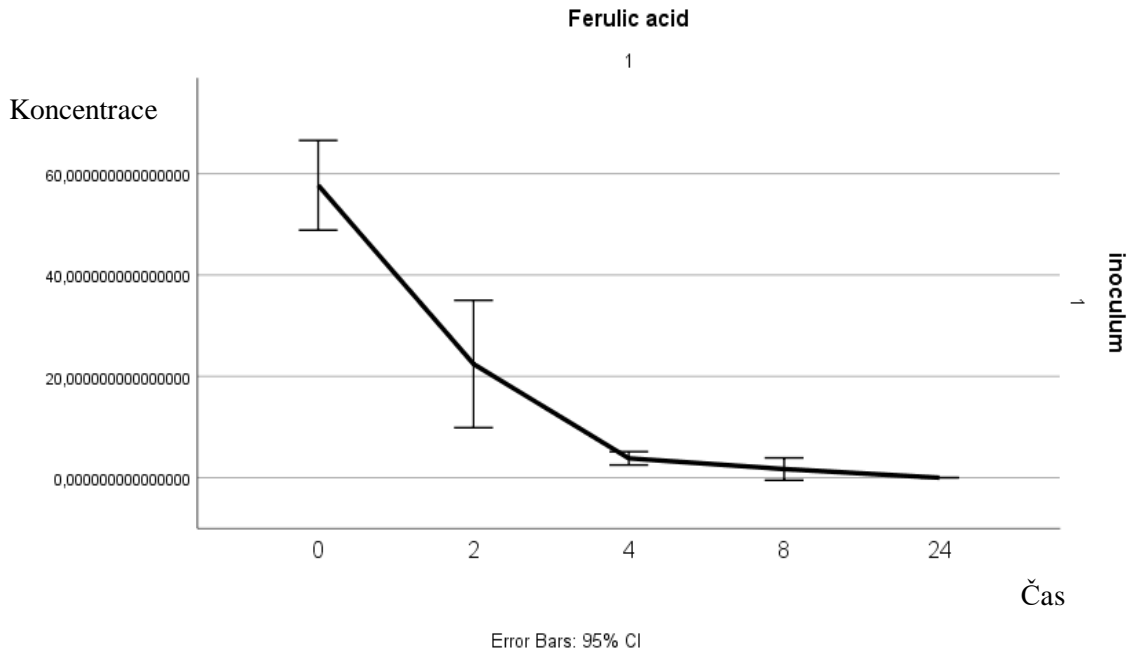
## 12 Seznam příloh

<b>Příloha č. 1</b> Lineární souhrný graf koncentrace ferulátu .....	I
<b>Příloha č. 2</b> Lineární souhrný graf koncentrace kyseliny hydroferulové .....	I
<b>Příloha č. 3</b> Lineární graf koncentrace kyseliny ferulové u pozitivní kontroly .....	II
<b>Příloha č. 4</b> Analýza rozptylu kyseliny ferulové u pozitivní kontroly .....	II

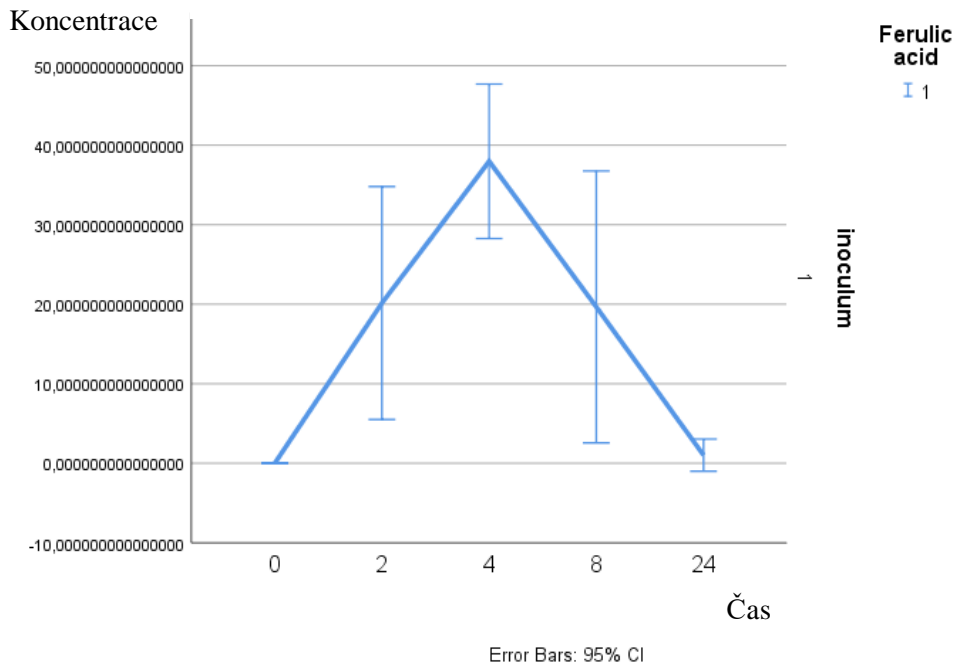


# 13 Samostatné přílohy

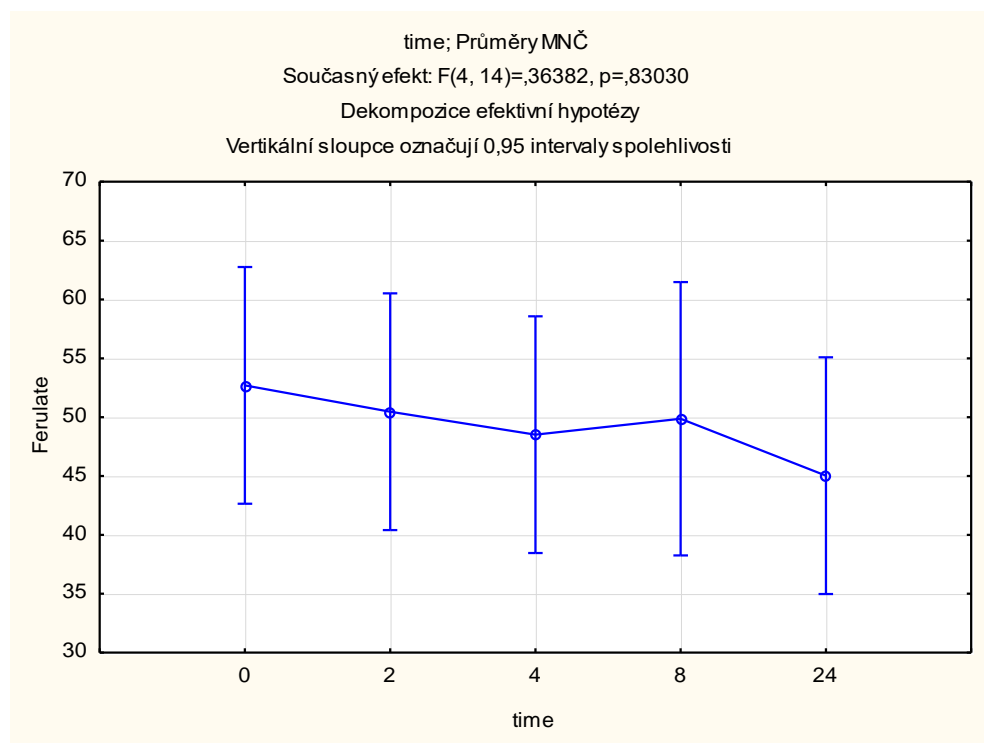
Příloha č. 1 Lineární souhrný graf koncentrace ferulátu



Příloha č. 2 Lineární souhrný graf koncentrace kyseliny hydroferulové



### Příloha č. 3 Lineární graf koncentrace kyseliny ferulové u pozitivní kontroly



### Příloha č. 4 Analýza rozptylu kyseliny ferulové u pozitivní kontroly

Č. buňky	Scheffeho test; proměnná Ferulate (concentrationsD1-D4) Pravděpodobnosti pro post-hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 87,875, sv = 14,000					
	time	1 52,699	2 50,459	3 48,515	4 49,866	5 45,031
1	0		0,998228	0,980820	0,996723	0,850194
2	2	0,998228		0,998980	0,999993	0,951322
3	4	0,980820	0,998980		0,999822	0,990302
4	8	0,996723	0,999993	0,999822		0,975464
5	24	0,850194	0,951322	0,990302	0,975464	