

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chemie



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

Sledování obsahových změn amygdalinu v plodech švestek

Diplomová práce

Bc. Dana Žížalová
Výživa a potraviny

Ing. Matyáš Orsák, Ph.D.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Sledování obsahových změn amygdalinu v plodech švestek" 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 neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 26.4.2021

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Matyáši Orsákovi, Ph.D. a Ing. Kláře Podhorecké za odborné vedení a cenné rady během vzniku diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala doc. Ing. Josefovi Susovi, CSc. za čas, který mi věnoval při sklizni švestek. Poděkování patří také Ing. Vladimírovi Pivcovi, CSc. za pomoc v laboratoři. Nakonec děkuji celé mé rodině za pomoc a podporu během psaní práce a zároveň během celého studia.

Sledování obsahových změn amygdalinu v plodech švestek

Souhrn

Náplní této diplomové práce bylo stanovení obsahu amygdalinu v plodech různých odrůd švestek (*Prunus domestica*). Teoretická část se zaměřuje na základní charakteristiku amygdalinu, jakou má strukturu a kde se nachází. Dále jsou zahrnuty pozitivní účinky na lidský organismus, ale také nebezpečí v podobě toxicity.

Amygdalin, jenž patří mezi kyanogenní glykosidy, se běžně vyskytuje v rostlinách čeledi růžovitých (*Rosaceae*). Vykazuje mnoho terapeutických účinků, proto je hojně používán v alternativní medicíně. Působí například jako analgetikum, proti zánětu a fibróze a tak dále. Amygdalin je také vyhledáván kvůli údajnému protinádorovému účinku. Tento účinek je zatím mezi vědci stále kontroverzním tématem. Na druhou stranu může amygdalin působit také toxicky, neboť je v těle enzymaticky rozkládán na kyanovodík. Ačkoliv je kyanovodík považován za účinnou látku amygdalinu, pro člověka je toxický a může způsobit otravu.

Cílem praktické části práce bylo zjištění a porovnání obsahu amygdalinu v jádrech švestek jednotlivých odrůd. Koncentrace amygdalinu byly měřeny pomocí metody HPLC/DAD a LC/MS. Pro analýzu bylo použito třináct odrůd švestek sklizených v České republice.

Dle výsledků bylo zjištěno, že je obsah amygdalinu rozdílný v závislosti na analyzované odrůdě. Metodou HPLC byla naměřena nejnižší koncentrace amygdalinu v jádrech švestek u odrůdy „Haganta“ (0,33 mg/g) a nejvyšší u „Valjevka“ (2,2 mg/g). Výsledky metody LC/MS ukazují nejnižší koncentrace amygdalinu v odrůdě „Toptaste“ (1,29 mg/g) a naopak nejvyšší v odrůdě „Čačanská lepotica“ (2,46 mg/g).

Klíčová slova: amygdalin, švestky, HPLC, kyanogenní glykosid, toxicita, kyanovodík

Monitoring of amygdalin content changes in plums

Summary

The content of this diploma thesis was to determine the content of amygdalin in the fruits of various varieties of plums (*Prunus domestica*). The theoretical part focuses on the basic characteristics of amygdalin, which means its chemical structure and its occurrence. This part of the thesis mentions its positive effects on the human body, but also the dangers in the form of its toxicity.

Amygdalin, one of the cyanogenic glycosides, is commonly found in plants of the *Rosaceae* family. It shows many therapeutic effects, so it is widely used in alternative medicine. On one hand, it acts as an analgesic, against inflammation and fibrosis, furthermore amygdalin is also sought after for its alleged anticancer effect. However, this effect is still a controversial scientific topic. On the other hand, amygdalin can also be toxic because it is enzymatically broken down in the body into hydrogen cyanide. Even though hydrogen cyanide is considered to be an active substance in amygdalin, it is toxic to humans and can cause poisoning.

The aim of the practical part of the work was to determine and compare the content of amygdalin in plum kernels of individual varieties. Amygdalin concentrations were measured by HPLC/DAD and LC/MS methods. Thirteen plum varieties harvested in the Czech Republic were used for the analysis.

The results showed that the amygdalin content is different depending on the variety analyzed. The lowest concentrations of amygdalin in plum kernels measured by HPLC were found in the "Haganta" variety (0.33 mg / g) and the highest concentrations were found in the "Valjevka" (2.2 mg / g). The results of the LC/MS method showed the lowest concentrations of amygdalin in the variety "Toptaste" (1.29 mg / g) and, to the contrary, the highest concentrations were found in the variety "Čačanská lepotica" (2.46 mg / g).

Keywords: amygdalin, plums, HPLC, cyanogenic glycoside, toxicity, hydrogen cyanide

Obsah

1 Úvod	10
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	11
3 Literární rešerše.....	12
3.1 Amygdalin.....	12
3.1.1 Chemické složení amygdalinu	12
3.1.2 Chybná označení.....	12
3.1.3 Množství amygdalinu v rostlinných druzích	13
3.1.4 Formy amygdalinu.....	14
3.2 Farmakologické účinky amygdalinu	14
3.2.1 Antifibrotický účinek.....	15
3.2.2 Protizánětlivý účinek	16
3.2.3 Analgetický účinek	16
3.2.4 Imunomodulační účinek	16
3.2.5 Antiaterosklerotický účinek.....	17
3.2.6 Vliv na reprodukční systém	17
3.2.7 Vliv na neurodegeneraci	17
3.2.8 Ostatní léčivé účinky	17
3.3 Protinádorové účinky amygdalinu	18
3.3.1 Historie amygdalinu/laetrilu jako protinádorové léčby	18
3.3.2 Vyvolání apoptózy.....	19
3.3.3 Snížení růstu nádorových buněk.....	19
3.3.4 Zamezení metastázování nádorových buněk	20
3.4 Toxicita amygdalinu.....	20
3.4.1 Případy toxicity amygdalinu.....	22
3.4.2 Léčba kyanidové toxicity.....	22
3.4.3 Množství kyanidu v rostlinných zástupcích.....	23
3.5 Slivoň švestka (<i>Prunus domestica</i>)	23
3.5.1 Čeleď růžovité (<i>Rosaceae</i>)	24
3.5.2 Rod slivoň (<i>Prunus</i>)	24
3.5.3 Popis slivoně švestky	25
3.5.4 Složení švestek.....	25

3.5.5	Význam švestek ve výživě člověka	26
3.5.6	Tržní odrůdy	26
3.5.6.1	Čačanská lepotica	27
3.5.6.2	Jojo.....	27
3.5.6.3	Elena	27
3.5.6.4	Presenta.....	27
3.5.6.5	Valjevka.....	27
3.5.6.6	Tophit.....	28
3.5.6.7	Topper.....	28
3.5.6.8	Haganta.....	28
3.5.6.9	Toptaste	28
3.5.6.10	Topend.....	28
3.5.6.11	Promis.....	28
4	Metodika.....	30
4.1	Rostlinný materiál.....	30
4.2	Přístroje.....	31
4.3	Pomůcky.....	31
4.4	Chemikálie	32
4.5	Příprava vzorků	32
4.6	Stanovení amygdalinu metodou HPLC.....	32
4.6.1	Podmínky analýzy	32
4.6.2	Kolona.....	33
4.6.3	Kalibrace.....	33
4.7	Stanovení amygdalinu metodou LC/MS.....	33
4.7.1	Podmínky detekce.....	33
4.7.2	Kolona.....	34
4.7.3	Chromatografická kolona a podmínky	34
5	Výsledky	35
5.1	Vyhodnocení amygdalinu HPLC/DAD	35
5.2	Vyhodnocení amygdalinu LC/MS	37
5.3	Celkové vyhodnocení	39
6	Diskuse.....	41
6.1	Obsah amygdalinu v jádrech švestek.....	41

6.2	Porovnání koncentrací amygdalinu v jádrech švestek	41
7	Závěr	43
8	Literatura.....	44
9	Seznam obrázků	I
10	Seznam tabulek	II

1 Úvod

Amygdalin je kyanogenní glykosid, který se přirozeně vyskytuje především v plodech druhů z čeledi růžovitých (Rosaceae). Lze ho nalézt v jádrech mandlí, meruněk, švestek, broskví a jiných druhů (Lv et al. 2017). Tyto glykosidy si rostliny tvoří z důvodu obrany proti predátorům nebo patogenům (Mosayyebi et al. 2020). Amygdalin je často nazýván také jako laetрил či vitamin B17. Tyto látky však nejde použít jako synonyma pro amygdalin, neboť se jedná o zcela jiné sloučeniny (Milazzo et al. 2007).

Už v dávných dobách byl amygdalin považován za přírodní lék. Lidé ho používali k léčbě různých nemocí jako je například astma, kašel, infekce a další. Dle dosud dostupných studií amygdalin vykazuje antifibrotické, protizánětlivé, analgetické, imunomodulační a antiaterosklerotické účinky. Také je známo, že působí příznivě na reprodukční systém (He et al. 2020). Tradiční čínská medicína používá amygdalin pro léčbu zánětu průdušek, astmatu, rozedmy plic, lepry, rakoviny tlustého střeva a vitiliga (Song & Xu 2014). Některé studie poukazují na protinádorový účinek. S tím souvisí i vyhledávání amygdalinu onkologickými pacienty, kteří se obrací na alternativní medicínu. Během této terapie se v některých případech stalo, že pacienti měli jako vedlejší účinek otravu kyanidem. Po přezkoumání protirakovinného účinku amygdalinu bylo zjištěno, že jsou důkazy nedostačující pro jeho potvrzení a amygdalin může být nebezpečný. Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) zakázal používání amygdalinu za účelem léčby. Navzdory neúspěšným testům a tomuto zákazu je amygdalin v některých zemích i nadále používán (Zhou et al. 2012).

Amygdalin se po perorálním podání v těle nevstřebává v nezměněné formě, ale je enzymaticky hydrolyzován na benzaldehyd, glukózu a kyanovodík. Předpokládá se, že právě kyanovodík je účinnou látkou amygdalinu (Třísková & Rudá Kučerová 2019). Tím se ale stává pochybným léčivem, neboť je kyanid pro člověka toxický a může dojít k otravě. Kyanid v těle omezuje dostupnost energie v buňkách, nejrychleji jeho účinek působí na dýchací soustavu a srdce (Ballhorn 2011). Mezi typické první projevy otravy kyanidem patří bolest hlavy, motolice, zmatenost, svalová slabost a jiné. Může způsobit také ochrnutí, bezvědomí a v nejhorším případě i smrt. Bylo zaznamenáno mnoho případů kyanidové otravy po požití meruňkových jader či samotného amygdalinu ve formě tablet (Blaheta et al. 2016).

Proto, aby bylo možné využívat léčivé potenciály amygdalinu, je zapotřebí dalšího zkoumání či možná vývoje jiného zpracování amygdalinu (He et al. 2020).

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Hlavním cílem práce je kvantitativní stanovení amygdalinu v extraktech semen švestek a následné zhodnocení v závislosti na různých odrůdách metodou HPLC/DAD. Součástí je optimalizace HPLC/DAD metody pro stanovení amygdalinu. Skutečné obsahy amygdalinu budou porovnány s výsledky odborné literatury.

Hypotézy:

- 1) Vhodnou HPLC metodou lze s dostatečnou spolehlivostí stanovit obsah amygdalinu v semenech švestek.
- 2) Obsah amygdalinu se v semenech vybraných odrůd slivoní významně liší.
- 3) Skutečné obsahy amygdalinu se v semenech švestek v některých případech významně liší v porovnání s literaturou.

3 Literární rešerše

3.1 Amygdalin

Amygdalin patří do kyanogenních glykosidů, což jsou látky, které si rostliny tvoří na svou obranu proti patogenům a predátorům (Mosayyebi et al. 2020). Jsou to tedy fytotoxiny, které se nacházejí v minimálně dvou tisících druhů rostlin (Speijers 2015). Amygdalin je jeden z nejběžnějších kyanogenních glykosidů. Dalšími jsou například linamarin, prunasin, lotaustralin a dhurrin. Mnoho těchto druhů je běžně konzumováno v rostlinné stravě (Bolarinwa et al. 2014).

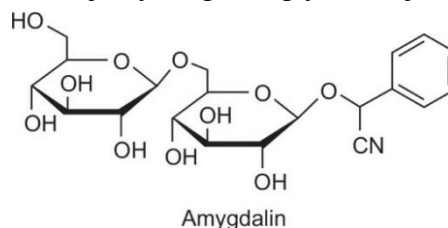
Amygdalin se vyskytuje přirozeně hlavně v jádrech, ale i jiných částech různých zástupců ovocných druhů čeledi růžovitých (*Rosaceae*). Nachází se například v jádrech meruňky (*Prunus armeniaca*), mandloně (*Prunus dulcis*), slivoně švestky (*Prunus domestica*), jabloně (*Malus domestica*) a v mnoha dalších ovocných dřevinách (Lv et al. 2017). Podle Williams (2018) se vyskytuje amygdalin také v jiných rostlinách, jako například v čiroku, jeteli a fazolích lima.

Poprvé byl amygdalin izolován ve 30. letech 19. století francouzskými chemiky Robiquetem a Boutron-Charlardem z hořkých mandlí (He et al. 2020). Roku 1837 byly poprvé charakterizovány chemické vlastnosti amygdalinu (Dorr & Paxinos 1978).

Lze se s ním setkat také pod názvem laetрил či vitamin B17. Tato označení jsou ale chybná, neboť se nejedná o totožné látky (Todorova et al. 2017).

3.1.1 Chemické složení amygdalinu

Amygdalin (D-mandelonitril-β-D-glukosid-6-β—glukosid) je kyanogenní glykosid, jenž je odvozen od aromatické aminokyseliny fenylalaninu. Molekulární vzorec amygdalinu je $C_{20}H_{27}NO_{11}$ a molekulová hmotnost 457,42 (Ayaz et al. 2020). Tento glykosid je složen z benzaldehydu, nitrilu a dvou molekul glukózy (Mosayyebi et al. 2020). Struktura je znázorněna na Obrázku 1.



Obrázek 1 - Struktura amygdalinu (Lee & Moon 2016)

V přírodě se vyskytuje pouze pravotočivá konfigurace amygdalinu, která je zároveň aktivní formou (Milazzo et al. 2007).

3.1.2 Chybná označení

Jak již bylo naznačeno, amygdalin bývá často označován jako laetрил nebo vitamin B17, ale není to jedna a ta samá látka. Laetрил se od přírodní sloučeniny strukturálně liší. Navzdory tomu jsou tyto názvy používány zaměnitelně (Milazzo et al. 2007).

Rozdílnost mezi amygdalinem a laetриlem je možné vidět třeba na chemickém vzorci. Zatímco amygdalin má vzorec $C_{20}H_{27}NO_{11}$, laetрил má o něco kratší vzorec $C_{14}H_{15}NO_7$. Oproti

amygdalinu ma laetril pouze jednu molekulu glukózy navázané na mandelonitril (Zhou et al. 2012). Podle Williams (2018) je termín „laetril“ odvozen ze slov laevorotatory (levotočivý) a mandelonitrile. Laetrem lze pojmenovat dvě odlišné látky. Jedná se o Laetril, který byl vyroben a patentován v 50. letech 20. století ve Spojených Státech. Tato látka je částečně syntetickou formou amygdalinu. V druhém případě jde o leatril, jenž byl vyroben v Mexiku z drcených meruňkových jader. Ani jeden z produktů ale nesplňoval standardy farmaceutických produktů USA, a proto nebyly odsouhlaseny Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA). I přesto byly produkty dále využívány k alternativní léčbě rakoviny (He et al. 2020).

Semisyntetický laetril je někdy uváděn jako vitamin B17, i když se o vitamin nejedná (Milazzo et al. 2007). Laetril byl pravděpodobně nazván vitaminem B17, aby mohl být prodáván jako doplněk výživy, nikoli jako lék. To umožnilo vyhnout se přísným zákonům, které se vztahují na léčiva (Lerner 1981).

3.1.3 Množství amygdalinu v rostlinných druzích

Bolarinwa et al. (2014) měřili množství amygdalinu za použití metody RP-HPLC v některých ovocných jádrech a zpracovaných produktech dostupných ve Velké Británii. K analýze byla použita jádra z plodů čeledi růžovitých (*Rosaceae*) zahrnující maruňky, černé a červené třešně, nektarinky, broskve, slívy, jablka a hrušky. Nejvyšší průměrná hodnota amygdalinu se naměřila u zelené slivoně (17,49 mg/g), meruňky (14,37 mg/g) a černé slivoně (10 mg/g). Dále následovaly hodnoty broskve (6,81 mg/g), červené třešně (3,89 mg/l), jablka (2,96 mg/g), černé třešně (2,68 mg/g) a fialové slivoně (2,16 mg/g). Nejnižší koncentrace byly zaznamenány u žluté slívy (1,54 mg/g), hrušky (1,29 mg/g), červené slívy (0,44 mg/g) a nektarinky (0,12mg/g) (viz Tabulka 1). Podle Ghiulai et al. (2006) se koncentrace amygdalinu v jádrech meruňek a švestek pohybovala v rozmezí 3–24 mg/kg.

Tabulka 1- Naměřené hodnoty amygdalinu v ovocných jádrech (Bolarinwa et al. 2014)

Fruit seeds	Amygdalin content (mg/g)
Apricot	14,37± 0,28
Cherry (black)	2,68± 0,02
Cherry (red)	3,89± 0,31
Nectarine (summer fire)	0,12± 0,01
Peach	6,81± 0,02
Plum (green)	17,49± 0,26
Plum (black, friar black)	10,00± 0,14
Plum (purple, larry anne)	2,16± 0,02
Plum (yellow, son gold)	1,54± 0,02
Plum (red, laetitia)	0,44± 0,04
Apple (royal gala)	2,96± 0,02
Pear (conference)	1,29± 0,04
Each value is expressed as mean ± standard deviation (n = 3 extractions)	

Množství amygdalinu se mění v průběhu vývoje ovoce a zároveň záleží, která část plodu je analyzována. Lee et al. (2017) měřili amygdalin v jádrech, endokarpech a mezokarpech u tří kultivarů broskví (Stone Peach, Hikawa Hakuho, Baekhyang) sklizených v Koreii. Měření probíhalo ve třech fázích vývoje ovoce (zpevňování pecky, zvětšení a zrání plodu). Bylo zjištěno, že ve všech fázích obsahovala jádra broskví více amygdalinu než mezokarp či endokarp. Celkově se obsah amygdalinu zvyšoval až do fáze zvětšení plodu, během zrání pak zůstal konstantní nebo se snížil. Zhao (2012) analyzoval koncentraci amygdalinu v různých fázích u čtyř druhů peckovin zahrnujících meruňky, sibiřské meruňky, broskve a švestky. Během období vývoje se obsah amygdalinu v jádrech zvýšil. V meruňkách hodnota vzrostla z 0,11 % na 3,26 %, v sibiřských meruňkách z 0,39 % na 5,1 %, v broskvích z 0,13 % na 3,73 % a ve švestkách z 0,28 % na 4,91 %. Podobně tomu bylo také u dužiny plodů, kde byly ale zaznamenány o něco nižší hodnoty amygdalinu. Chen et al. (2020) měřili amygdalin v jádrech 19 odrůd meruněk. Průměrný obsah amygdalinu byl $164,7 \pm 11,1$ mg/100 g. Yildirim & Askin (2010) se ve své studii zabývali množstvím amygdalinu v jádrech deseti různých kultivarů sladkých i hořkých meruněk. Bylo zjištěno, že hořké kultivary obsahují mnohem více amygdalinu než sladké. V hořkých kultivarech se obsah amygdalinu na 100 g pohyboval v rozmezí 1,58-6,35 g a ve sladkých kultivarech to bylo rozmezí 0-0,97 g.

Obsah amygdalinu ve zpracovaných produktech je nižší, než v ovocných semenech a jádrech (Bolarinwa et al. 2014).

3.1.4 Formy amygdalinu

Jak už bylo zmíněno, amygdalin se přirozeně vyskytuje v surových potravinách, jako jsou meruňková jádra. Někteří výrobci jádra meruněk melou na prášek, který prodají ve formě tablet nebo tobolek. Jindy se z meruňkových jader amygdalin extrahuje a poté zpracovává do tablet, tobolek, ale také roztoků pro injekční podávání. Na trhu jsou také pleťová mléka a kapaliny pro zavedení do konečníku (Martini 2018).

3.2 Farmakologické účinky amygdalinu

Amygdalin je už poměrně dlouhou dobu znám a uplatňován v tradiční čínské medicíně kvůli účinkům podporujícím vykašlávání a protinádorovému působení. V poslední době narůstá stále větší zájem o alternativní medicínu ze strany pacientů. Ta je například využívána samostatně či společně s konvenční léčbou (Třísková & Rudá Kučerová 2019). Amygdalin se nejčastěji užívá v kombinaci s urinoterapií, metabolickou terapií nebo nitrožilní aplikací beta-glukosidázy. V tradiční medicíně se amygdalin využívá na léčení zánětu průdušek, astmatu, rozedmy plic (emfyzému), malomocenství (lepry), rakoviny tlustého střeva a vitiliga (Song & Xu 2014).

Na účinky amygdalinu jsou stále prováděny studie, ale nyní je již známo, že působí proti fibróze (Guo et al. 2013; Luo et al. 2016; Luo et al. 2018; Zhang et al. 2018; He et al. 2020), zánětům (Yang et al. 2007; Hwang et al. 2008B; Luo et al. 2015) a bolesti (Hwang et al. 2008A; Hwang et al. 2008B). Dále má amygdalin imunomodulační (Zheng et al. 2009; Dogru et al. 2017; He et al. 2020) a antiaterosklerotický účinek (Deng et al. 2012; Zhao & Yang 2012; Lv

et al. 2017; Moslehi et al. 2018). Ovlivňuje reprodukční systém (Tanyildizi & Bozkurt 2002; Helenar et al. 2015) a neurodegeneraci (Yang et al. 2014; Cheng et al. 2015). Dle Teodorova et al. (2017) působí také jako prevence proti hypertonii, astmatu, bronchitidě, emfyzému, lepře a cukrovce. V poslední době je velká pozornost věnována především protinádorovým účinkům (He et al. 2020).

Po požití se v těle amygdalin jako takový neabsorbuje, ale rozkládá se v tenkém a tlustém střevě. Existují tak dvě metabolické cesty amygdalinu. V tenkém střevě je v jejunu enzymaticky rozkládán beta-glukosidázou na glukózu a prunasin (D-mandelonitril- β -D-glukosid) (Wagner & Galey 2003). Zmíněný enzym beta-glukosidáza může být obsažen například v mandlích a meruňkových jádrech nebo ho produkují některé střevní bakterie (Bromley et al. 2005). Prunasin je poté přenesen přes střevní sliznici do krevního řečiště prostřednictvím sodíko-glukózových kotransportérů SGLT1. Následně je vstřebaný prunasin vylučován ledvinami bez tvorby benzaldehydu nebo kyanidu (Wagner & Galey 2003). Zbýlý prunasin přetrvávající v trávicí soustavě je dále rozkládán beta-glukosidázou na mandelonitril, který není příliš stabilní sloučeninou. Ten může být ve střevě buď hydroxylován na hydroxymandelonitril, jenž prostupuje střevní stěnou, nebo se může štěpit na benzaldehyd a kyanid. Předpokládá se, že právě kyanid je účinnou látkou amygdalinu (Shim & Kwon 2010). V tlustém střevě je amygdalin hydrolyzován střevní mikrobiotou na benzaldehyd, glukózu a kyanid (Strugala et al. 1995). Kyanid prochází střevní stěnou a během 1,5 až 2 hodin nabývá nejvyšší hodnoty v krvi. Poté je za pomoci enzymů rhodanázy a 3-merkaptopyruvát sulfurtransferázy detoxikován a přetvořen na thiokyanát a ten je z těla vyloučen ledvinami (Blaheta et al. 2016). Množství enzymů, které mají schopnost degradovat kyanid, se liší v závislosti na tkáni. Nejvyšší koncentrace byly nalezeny v játrech a ledvinách (Sylvester & Sander 1990). Rozdělení subcelulárních enzymů není stejné. Zatímco 3-merkaptopyruvát sulfurtransferáza se vyskytuje v cytoplazmě a mitochondriích, rhodanáza je přítomna pouze v mitochondriích (Blaheta et al. 2016). Studie poukazují na nedostatek rhodanázy u maligních buněk (Milazzo et al. 2007).

Bylo zjištěno, že bakterie *Bacteroides fragilis* jsou nejaktivnějším bakteriálním druhem v lidském tlustém střevě. Podílejí se na produkci beta-glukosidázy a tím napomáhají k rozkladu amygdalinu. Ostatní střevní bakterie mají nižší aktivitu beta-glukosidázy (Blaheta et al. 2016).

3.2.1 Antifibrotický účinek

Studie o amygdalinu ukázaly, že působí jako antifibrotikum (He et al. 2020). Jaterní fibróza vzniká jako reakce na poškození jater. Pokud tento stav přetrvává, může vést ke vzniku cirhózy jater. Tuto fibrózu zprostředkovávají jaterní hvězdicové buňky (HSC), známé také jako Itovy, které začnou produkovat kolagen a mezibuněčnou hmotu. Byla provedena studie, ve které se ošetřily buňky HSC-T6 amygdalinem. Výsledky naznačily, že je amygdalin schopen inhibovat aktivaci HSC, což je následkem potlačení exprese transformujícího růstového faktoru beta (TGF- β) (Luo et al. 2016). Amygdalin zmírnil syntézu a uvolňování PDGF (růstový faktor odvozený z krevních destiček) a IGF (růstový faktor podobný inzulinu) snížením transkripce mRNA u těchto faktorů a exprese PDGF. Tím se omezil vliv růstových faktorů na HSC buňky, což na játra působilo protektivně před fibrózou (Luo et al. 2018).

Dle Guo et al. (2013) provedené ošetření ledvinových fibroblastů amygdalinem vedlo k inhibici jejich proliferace a produkce transformujícího růstového faktoru beta. Došlo také k eliminaci hromadění extracelulární matrix. Poškození ledvin se zlepšilo již po jednadvaceti dnech. Chronická pankreatitida (CP), neboli chronický zánět slinivky břišní, je charakterizován progresivní fibrózou. U potkanů s tímto onemocněním žilně aplikovaný amygdalin snížil produkci profibrotických cytokinů, bránil aktivaci pankreatických hvězdicových buněk (PSC), které mají hlavní funkci při produkci fibrózy slinivky břišní (Zhang et al. 2018).

3.2.2 Protizánětlivý účinek

V zánětlivých reakcích je lipopolysacharidy stimulovaná produkce zánětlivých mediátorů, mezi které patří oxid dusnatý, faktor nádorové nekrózy alfa (TNF- α), interleukiny (např. IL-1), prostaglandin E₂ (PGE₂) a leukotrieny (Lee et al. 1992). Prostaglandin E₂ je přeměňován cyklooxygenázou (COX) z arachidonové kyseliny (Chang et al. 2005).

Dle Yang et al. (2007) amygdalin získaný z jader meruňky potlačoval prostaglandin E₂ a zároveň produkci oxidu dusnatého. U potkanů s vyvolanou artritidou amygdalin inhiboval expresi i hladinu TNF- α (Luo et al. 2015). Studie Chang et al. (2005) studie prokázala, že jádra meruňky vykazovala protizánětlivé účinky tlumením cyklooxygenázy 2 (COX-2) a došlo k inhibici syntézy prostaglandinu E₂ a oxidu dusnatého (Chang et al. 2005).

Hwang et al. (2008B) uvádí, že nejvýznamnější protizánětlivý účinek v prováděné studii byl pozorován u dávky amygdalinu 0,005mg/kg. Po této dávce byly významně inhibovány exprese TNF- α a IL-1 β v míše. Autoimunitní hepatitida (AIH) je imunitně zprostředkovaný zánět jater, který se vyznačuje rozvráceným jaterním parenchymem a pronikáním zánětlivých buněk. Studie prokázala, že předběžné podávání amygdalinu zpomaluje u myši s autoimunitní hepatitidou infiltraci buněk a chrání jaterní tkáň (Elsaed 2019).

3.2.3 Analgetický účinek

Injekčně aplikovaný amygdalin potkanům významně snižoval tonickou bolest způsobenou vodným roztokem formaldehydu (Hwang et al. 2008A). V další studii se u potkanů s artrózou kotníku ukázalo, že pro zmírnění zvýšené vnímavosti bolesti, byla nejúčinnější dávka amygdalinu 0,005mg/kg (Hwang et al. 2008B). Podle těchto studií lze použít amygdalin jako analgetikum.

3.2.4 Imunomodulační účinek

Zheng et al. (2009) provedli studii na proliferaci urychlené kondenzace chromozómů (PCC) v T-lymfocytech, která byla indukována amygdalinem. Amygdalin značně podporoval proliferaci T-lymfocytů. Jako nejúčinnější se projevila koncentrace 200 mg/l. Některé studie ukazují, že amygdalin podporuje funkci imunitního systému. Imunitní buňky jsou rozhodujícími patogenními činiteli ve vzniku a růstu endometriózy (He et al. 2020). V provedeném výzkumu amygdalin měl vliv na lokální aktivitu imunitních buněk a podstatně snižoval rozsahy endometriotických ložisek (Dogru et al. 2017).

3.2.5 Antiaterosklerotický účinek

U testovaných myší způsobil amygdalin pokles hladiny triglyceridů, celkového cholesterolu a lipoproteinů s nízkou hustotou (LDL), u jedinců s nedostatkem lipoproteinových receptorů s nízkou hustotou (Lv et al. 2017). V další studii zaměřené na zlepšení progresu aterosklerózy byl myším na dietě s vysokým obsahem tuků podáván amygdalin, probukol a kombinace obou látek. Nejlepších výsledků dosáhla kombinovaná léčba, neboť snížila hladinu celkového cholesterolu a ploch aterosklerotických plátů (ateromů), účinněji zpomalila progresi aterosklerotické léze (Deng et al. 2012). Podle Zhao & Yang (2012) amygdalin inhiboval expresi a aktivitu Toll-like receptorů a tím způsobil progresi aterosklerózy. Moslehi et al. (2018) píše o zlepšení sérové hladiny lipidů a enzymů aspartátaminotransferázy (ASP) a alaninaminotransferázy (ALT) u myší, kterým byl injekčně aplikován tunikamycin pro vyvolání stresu.

3.2.6 Vliv na reprodukční systém

V *in vitro* studii zkoumající účinky amygdalinu na sekreci steroidních hormonů bylo zjištěno, že amygdalin (10 000 µg/ml) zapříčinil podstatnou stimulaci uvolňování 17- β -estradiolu (Helenar et al. 2015). V jiné studii na býcích byl sledován účinek amygdalinu na aktivitu hyaluronidázy spermií, hybnost spermií a jejich morfologii. Amygdalin (0,4-2 mmol/l) značně snižoval aktivitu hyaluronidázy a zároveň závisle na dávce snižoval i pohyblivost spermií. (Tanyildizi & Bozkurt 2002).

3.2.7 Vliv na neurodegeneraci

Neurodegenerace je popsána jako progresivní ztráta struktury nebo funkce neuronů. Mezi nejčastější neurodegenerační onemocnění patří Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, Huntingtonova choroba, demence s Lewyho tělísky a amyotrofická laterální skleróza (Merino 2019).

Amygdalin dokázal, v závislosti na koncentraci (2,5-20 mmol/l), zvýšit přežití buněk PC12 proti neurotoxicitě oxidopaminu až po dobu 12 hodin a zároveň zvyšoval růst neuritů (Cheng et al. 2015). Yang et al. (2014) uvádí, že v provedené studii amygdalin indukoval růst neuritů PC12 v závislosti na koncentraci. Z výsledků lze vyčíst, že může amygdalin ochránit buňky před neurotoxitou a mohl by být potenciálním léčivem neurodegenerativních onemocnění.

3.2.8 Ostatní léčivé účinky

V provedené studii na myších se zlomeninou holenní kosti měl amygdalin pozitivní vliv na léčbu zlomeniny (Ying et al. 2020). Dále amygdalin snižuje nitrooční tlak, tudíž působí proti glaukomu známému také jako zelený zákal (Zeng et al. 2020). Ukázalo se, že dokáže amygdalin zmírňovat žaludeční vředy, zmenšuje plochu vředů, podporuje jejich hojení a snižuje aktivitu pepsinu (Cai et al. 2003). Studie Luo et al. (2016) kromě antifibrotického účinku ukázala také

inhibiční schopnost amygdalinu na proliferaci vyvolanou acetaldehydem u buněčné linie HSC-T6.

3.3 Protinádorové účinky amygdalinu

Spousta průzkumů uvádí, že mnoho lidí s diagnostikovanou rakovinou se obrací k alternativní léčbě v naději, že tato léčba bude účinná. Některé alternativní terapie rakoviny jsou podloženy povzbuzujícími důkazy. Naopak některé z nich jsou bohužel riskantní, neboť není dostatek důkazů o jejich účinnosti (Milazzo et al. 2015). Také kvalita informací o doplňkové a alternativní medicíně pro léčbu rakoviny může případně pacienty vážně oklamat (Schmidt & Ernst 2004). Paradoxně jsou stále neověřené produkty či terapie stále doporučovány a nabízeny na internetu. Propagaci a prodej laetrilu, amygdalinu nebo meruňkových jader lze najít na různých webových stránkách, kde jsou mnohdy uváděna pochybná tvrzení týkající se výhod pro pacienty s rakovinou (Lilienthal 2014).

Po enzymatické degradaci amygdalinu nebo laetrilu se uvolňuje kyanid, jenž je považován za složku odpovědnou za údajný protirakovinový účinek. Teorií je, že jsou maligní buňky specificky citlivé na kyanogenní glykosidy kvůli vyšším hladinám beta-glukosidáz a beta-glukuronidázy ve srovnání s normálními buňkami. To by přispělo k rychlejšímu intracelulárnímu uvolňování kyanidu z amygdalinu nebo laetrilu a deficitu enzymu rhodenázy, který přeměňuje kyanid na neškodnou sloučeninu thiokyanát (Milazzo et al. 2015). Martini (2018) uvádí tuto teorii jako chybnou. Naproti tomu Blaheta et al. (2016) zjistili, že při absenci beta-glukosidázy má amygdalin stále protinádorové vlastnosti, což vede k možnosti, že za tento účinek nemusí být odpovědný právě kyanid.

Několik studií ukázalo, že amygdalin může indukovat apoptózu, inhibovat růst a metastázování rakovinných buněk (Martini 2018).

3.3.1 Historie amygdalinu/laetrilu jako protinádorové léčby

Poté, co byl amygdalin poprvé izolován, začal se roku 1845 v Rusku zkoušet na léčení rakoviny. Nebyl zaznamenán žádný výsledek, ale naopak se amygdalin ukázal jako toxický. První použití amygdalinu ústně jako protirakovinné léčby v USA bylo v 20. letech 20. století, avšak následující lékařské vyšetření lékařem Ernstem Theodorem Krebsem odhalilo jeho toxicitu pro člověka (He et al. 2020).

V padesátých letech byla vynalezena synem Dr. Krebse, Ernstem Theodorem Krebsem, nová forma amygdalinu s nižší toxicitou a oslišnou strukturou. Tato forma byla patentována jako laetril a zároveň byla nazvána vitamin B17 (He et al. 2020). V 70. letech stoupl zájem o laetril, jenž se stal jednou z nejoblíbenějších protinádorových možností. Do roku 1978 bylo oznámeno 70 000 amerických pacientů s rakovinou, kteří laetril požívali jako doplňkový a alternativní způsob léčení (Qian et al. 2015). Analýza čistoty ústní a mimostřevní formy amygdalinu vyráběného společností Cyto Pharma v Mexiku podle Národního institutu pro rakovinu (NCI) ukázala, že ani jeden produkt nesplňoval americké drogové standardy. Z tohoto důvodu se nepodařilo získat souhlas od Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) (Davignon et al. 1978). I přesto, že Spojené státy americké koncem sedmdesátých let zakázaly import

amygdalinu, je legální ve 23 státech USA. Podává se pouze pacientům v terminálním stavu nemoci (Třísková & Rudá Kučerová 2019).

Navzdory neúspěchu klinických testů prokazujících protirakovinné účinky se amygdalin nadále vyrábí a uvádí jako protinádorová léčba v oblastech severní Evropy a Mexika (Zhou et al. 2012). Ve Velké Británii se tyto produkty získávají jen na lékařský předpis a užívají se pod lékařským dohledem (Milazzo et al. 2007). Oproti tomu, německý Spolkový institut pro léčiva a zdravotnické prostředky (BfArM), klasifikoval amygdalin jako účinný lék. Nejméně 35 klinik nebo lékařských ordinací v Německu nabízí amygdalin v rámci protinádorové terapie (Blaheta et al. 2016).

Navrhovaný mechanismus protirakovinného působení amygdalinu se v průběhu let měnil, ale pravděpodobně nejrozšířenějším tvrzením je to, že jsou neoplastické buňky bohaté na enzym, který způsobuje uvolňování kyanidu z amygdalinu a kyanid poté ničí neoplastické buňky (Bromley et al. 2005).

3.3.2 Vyvolání apoptózy

Jedním ze způsobů protirakovinného působení amygdalinu je indukce apoptózy neboli programované buněčné smrti. Jedná se o cílený proces usmrcení buňky a poté její odstranění tak, aby nedošlo k poškození okolí. Tohoto procesu se účastní cysteinové proteázy neboli kaspázy a proteiny Bcl-2 rodiny, která zahrnuje jak proteiny proapoptické tak i antiapoptické. Proapoptický protein buněčnou smrt podporuje, zatímco antiapoptický usměřňuje a brání procesu (Chang et al. 2006).

Amygdalin vyvolal programovanou buněčnou smrt v lidských buňkách rakoviny prostaty DU145 a LNCaP. Po léčbě amygdalinem došlo ke zvýšení exprese proapoptického proteinu Bax, snížení exprese antiapoptického proteinu Bcl-2 a zároveň se v těchto buňkách zvýšila aktivita enzymu kaspázy-3 (Chang et al. 2006). Moradipoodeh et al. (2020) uvádí, že amygdalin zvyšoval expresi proteinu Bax a současně snižoval expresi proteinu Bcl-2 v buněčné linii rakoviny prsu SK-BR-3. Dle Zhou et al. (2012) měl amygdalin pozitivní účinek také na lidskou buněčnou linii hepatocelulárního karcinomu (HepG2), u které bylo zaznamenáno vyšší procento apoptózy. Také El-Desouky et al. (2020) zkoumali účinek amygdalinu na buněčnou linii hepatocelulárního karcinomu v kombinaci se zinkem či bez něj. Již samotný amygdalin podporuje programovanou buněčnou smrt, jeho účinnost se ale při léčbě HepG2 zvýšila za současného přidání zinku. U buněčné linie rakoviny děložního čípku HeLa napomáhal amygdalin k apoptóze pomocí zvýšení kaspázy-3 a exprese Bax a snížením exprese Bcl-2 (Chen et al. 2012). Lee & Moon (2016) ve své studii sledovali účinek amygdalinu na triple negativní karcinom prsu (TNBC). Podle výsledků amygdalin zvyšoval expresi proapoptického proteinu a snižoval antiapoptický protein a kaspázu-3, což vede k indukci apoptózy.

3.3.3 Snížení růstu nádorových buněk

Zhou et al. (2020) provedli studii na myších, jejíž výsledky ukázaly, že amygdalin inhiboval růst nádorových buněk prostaty. Makarević et al. (2016) vystavili buněčné linie

rakoviny prostaty LNCaP, DU-145 a PC3 různým koncentracím amygdalinu. Buněčná proliferace byla inhibována regulací buněčného cyklu. Snížení růstu buněk záviselo na dávce, kdy byl nejefektivnější účinek při 10 mg/ml. U lidské buněčné linie rakoviny jater HepG2 byla po podávání zaznamenána inhibice proliferace rakovinných buněk. Inhibice byla závislá na dávce a času (Zhou et al. 2012). Amygdalin inhiboval proliferaci též hepatocelulárního karcinomu souvisejícího s virem hepatitidy B (HBV) (Wang et al. 2021). Dle Abboud et al. (2019) amygdalin dokázal snížit růst buněk v buněčné linii karcinomu prsu MCF-7 a T47D. V nemalobuněčných liniích karcinomu plic amygdalin utlumil buněčnou proliferaci. K účinku došlo u dávek 2,5 mg/ml a 5 mg/ml (Qian et al. 2015). Arshi et al. (2019) zkoumali účinek amygdalinu na antiapoptické geny (Survivin a XIAP) v lidských buňkách rakoviny prsu (MCF-7), plic (A549) a žaludku (AGS). Výsledky ukázaly, že amygdalin významně inhiboval hladinu exprese genů Survivin a XIAP. Po aplikaci amygdalinu byla také inhibována proliferace u buněk lidského karcinomu tlustého střeva SNU-C4 (Park et al. 2005). Ve studii Juengel et al. (2016) byl zkoumán účinek amygdalinu na růst buněk rakoviny ledviny (RCC). Amygdalinem (10 mg/ml) byly ošetřeny buněčné linie Caki-1, KTC-26 a A498 na dobu 24 hodin nebo dvou týdnů. Amygdalin u všech třech linií vedl ke značnému snížení růstu a proliferace buněk tohoto karcinomu.

3.3.4 Zamezení metastázování nádorových buněk

Metastázy bývají jednou z hlavních příčin úmrtí pacientů s rakovinou. Rakovinné buňky totiž mohou metastázovat do důležitých orgánů, kde klonování a růst těchto buněk vede k porušení a ohrožení života člověka (Qian et al. 2015). Podle Wang et al. (2021) amygdalin inhibuje vniknutí a migraci buněk hepatocelulárního karcinomu souvisejícího s virem hepatitidy B (HBV) prostřednictvím buněčné imunity zprostředkované T-lymfocyty. Qian et al. (2015) použili amygdalin na vysoce metastazující buněčné linie nemalobuněčného karcinomu plic. Následně došlo k potlačení invazivní a migrační schopnosti buněk.

3.4 Toxicita amygdalinu

Amygdalin se stal sice populárním v oblasti léčby rakoviny, ale zároveň je sporným léčivem. Nevýhodou perorálního podání amygdalinu je riziko otravy. Nejedná se o otravu samotným amygdalinem, nýbrž o otravu kyanidem, který může vznikat ve střevech hydrolýzou amygdalinu (He et al. 2020). Tato hydrolýza je podporována beta-glukosidázami, teplotou, anorganickými kyselinami a vysokými dávkami askorbové kyseliny (vitamin C) (Bromley et al. 2005). Kyanid vykazuje cytotoxické účinky pomocí inhibice enzymu cytochrom c oxidázy transportního řetězce elektronů v mitochondriích, a nakonec vede k lýze buněk (Mosayyebi et al. 2020). Kyanid způsobuje zvýšení hladiny glukózy a mléčné kyseliny v krvi a snížení fyziologického poměru ATP/ADP, čímž dochází k posunu od aerobního metabolismu k anaerobnímu (Bromley et al. 2005). Kyanidem se aktivuje glykogenolýza a glukóza je přesouvána do pentózofosfátového cyklu, čímž se snižuje rychlost glykolýzy a inhibuje cyklus trikarboxylových kyselin. Požití kyanovodíku omezuje dostupnost energie ve všech buňkách, ale jeho účinek působí nejrychleji na dýchací soustavu a srdce. Tento účinek je dále podporován

obsazením vazebného místa pro kyslík na hemoglobinu kyanidem, čímž se snižují transportní kapacity kyslíku v krvi. Vedle toho může kyanid inhibovat i jiné metaloenzymy, z nichž většina obsahuje železo, měď nebo molybden (Ballhorn 2011). Hlavní obranou těla proti toxickým účinkům kyanidu je jeho přeměna na thiokyanát, zprostředkovaná intramitochondriálním enzymem rodanázou (Speijers 2015). Proti kyanidové toxicitě napomáhají také probiotika, organismy jako *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, které podporují zdraví střev (Jaswal et al. 2018).

Typickými projevy otravy kyanidem jsou bolesti hlavy, závratě, zmatenost, svalová slabost a jiné. Chronická otrava poté může způsobit těžký stupeň ochrnutí, bezvědomí, a dokonce i smrt (Blaheta et al. 2016). Kromě toho může chronická otrava vyvolat neurodegenerativní onemocnění, mezi která patří například tropická ataxická polyneuropatie, amyotrofická laterální skleróza a jiné. Dále může negativně působit na reprodukci, včetně snížení porodnosti a zvýšení počtu úmrtí novorozenců (Cox & Sacks 2002). Je potřeba zmínit, že toxická hladina kyanidu v čistém amygdalinu nebyla zatím definována. Britský Výbor pro toxicitu chemických látek v potravinách, spotřebních výrobcích a životním prostředí (COT) odhadl, že pro vyvolání toxických účinků u dospělého člověka je zapotřebí zkonsumovat 10 meruňkových jader za den (Blaheta et al. 2016). Podle Chaouali et al. (2013) je, na základě průměrné hladiny kyanidu v hořkých mandlích (1062 ± 149 mg/kg), pro dospělou osobu smrtelnou dávkou požití 50 hořkých mandlí najednou. Pro dítě odhadují smrtelnou dávku 5 až 10 hořkých mandlí. Speijers (2015) uvádí jako smrtící hodnotu 500 μg kyanidu na 1dl krve. Dle Sauer et al. (2015) je normální hladina kyanidu v séru nižší než 50 $\mu\text{g/l}$. Toxická hladina je potom větší než 200 $\mu\text{g/l}$ a smrtelná větší než 3000 $\mu\text{g/l}$. Toxická reakce na ústně podávaný amygdalin se může u jednotlivých jedinců značně lišit. Ku příkladu je popsán případ, kdy pacient užíval dvojnásobně více své obvyklé perorální dávky a hladina kyanidu v jeho krvi byla 600 $\mu\text{g/dl}$. Přesto nevykazoval žádné z příznaků toxicity (Maxwell 1978). Při intravenózním podání amygdalinu nebyl prokázán toxický účinek (Blaheta et al. 2016). Společnost ProTox prováděla analýzu toxicity u amygdalinu určeného k orálnímu podání. Toxicita amygdalinu byla popsána hodnotou 4, zatímco jeho předpokládaná LD50 byla 405 mg/kg. Stupnice toxicity se pohybuje v rozmezí 1 až 6, hodnoty od 1 do 3 znamenají vysokou míru toxicity a hodnoty 4 až 6 jsou přijatelné (Ayaz et al. 2020).

Amygdalin lze snadno zakoupit na internetu, často bez mezinárodně uznávaného certifikátu o jeho kvalitě a často bez jakékoli předchozí kontroly chemické nebo bakteriální kontaminace (Blaheta et al. 2016). Lidé užívající purifikovaný amygdalin by se měli striktně vyhnout současné konzumaci meruňkových jader. Mimoto je potřeba se vyvarovat kombinování amygdalinu s vitamínem C, neboť jak je uvedeno výše, vitamín C zvyšuje *in vitro* přeměnu amygdalinu na kyanid a také zároveň snižuje tělesné zásoby aminokyseliny cysteinu, která se podílí na detoxikaci kyanidu. Je evidován případ dospělé pacientky s rakovinou močového mechýře, která zkonsumovala 3 g amygdalinu najednou s vitamínem C (4800 mg), jenž užívala denně. Dotyčná byl následně hospitalizována s poruchou vědomí, záchvaty a těžkou laktátovou acidózou (Bromley et al. 2015). Na základě těchto znalostí ale není jasné, proč někteří odborníci stále doporučují kombinaci vitamínu C a amygdalinu (Blaheta et al. 2016). Riziko kyanidové otravy se může zvýšit také u osob s genetickou predispozicí ke snížené schopnosti detoxikovat kyanid (Milazzo et al. 2015) a u vegetariánů s nedostatkem vitamínu B12 (Chan 2006).

Toxicitě kyanogenních potravin se dá předcházet. Potenciál toxicity se před konzumací snižuje způsoby zpracování, jako je loupání, drcení, mletí, strouhání, namáčení, fermentace a sušení. Těmito způsoby dochází například ke ztrátě ve vodě rozpustných glykosidů nebo k produkci kyseliny kyanovodíkové, která se před konzumací uvolní do atmosféry. (Bolarinwa et al. 2014).

3.4.1 Případy toxicity amygdalinu

Eviduje se několik případů toxicity navozených perorální konzumací amygdalinu, mezi nimi jsou i děti do 5 let (Blaheta et al. 2016). V jednom případě se jednalo dokonce o jedenáctiměsíční dítě, které omylem polklo 1–5 500 mg tablet amygdalinu. Letargické dítě upadlo do kómatu a po 71 hodinách od požití zemřelo (Humbert et al. 1977).

Dalším pacientem bylo dvouleté dítě, kterému byl podáván amygdalin 500 mg ústně a k tomu dalších 3,5 g jako klystýr. Pacient začal vykazovat typické známky otravy kyanidem (zvracení, průjem, letargie, zrychlené dýchání a cyanóza) až po druhé rektální dávce (Ortega & Creek 1978). Podle Morse et al. (1979) je otrava kyanidem častější spíše při rektálním podáním amygdalinového klystýru než při perorálním podáním.

Při užívání doplňkové a alternativní medicíny byl v Německu zaznamenán případ těžké otravy kyanidem. Jednalo se o encefalopatického, nereagujícího čtyřletého chlapce s anamnézou metastatického karcinomu mozku. Podle Glasglowské stupnice vědomí (15-3) se chlapec nacházel v počáteční úrovni těžké poruchy vědomí. Rodiče dítěte lékařům sdělili, že byl chlapci podáván perorálně a intravenózně vitamin B17 po dobu přibližně jednoho týdne. Hladina kyanidu v séru byla 52 µg/dl. Chlapci byla ihned nasazena léčba thiosíranem sodným a již po 2 hodinách bylo zaznamenáno zlepšení klinického stavu pacienta (Sauer et al. 2015).

Krátce po polknutí asi 12 g amygdalinu se u dospělého pacienta objevily závratě, tetanické zkrácení rukou, křeče po těle. Poté pacient upadl do kómatu a o den později zemřel (Blaheta et al. 2016).

Shively et al. (2019) popisují případ dospělé zdravé ženy, která úmyslně požila 40 tobolek doplňku amygdalinu. Pacientka byla rozrušená, blouznila, nadměrně se potila a měla rozšířené zorničky. Byla nasazena léčba hydroxykobalaminem společně s thiosíranem sodným, která vedla ke zlepšení zdravotního stavu a pacientka mohla být po několika dnech propuštěna.

3.4.2 Léčba kyanidové toxicity

Po zjištění diagnózy je nutné započít léčbu a podat pacientovi antidotum. Dříve byly používány protilátky, které mohly způsobit toxicitu jimi samotnými. V dnešní době se používá přípravek Cynokit (hydroxokobalamin), jenž nemá žádné klinicky významné nepříznivé vedlejší účinky (Oyewole & Olayinka 2009). Otrava kyanidem může být dále léčena dusitanem amylnatým neboli amylnitrem a dusitanem sodným v kombinaci s thiosíranem sodným (Jaswal et al. 2018).

3.4.3 Množství kyanidu v rostlinných zástupcích

Kyanovodík obsahuje velké množství rostlin. Některé rostlinné druhy syntetizují a akumulují sloučeniny obsahující kyanid a pravděpodobně všechny vyšší rostliny tvoří nízkou hladinu kyanovodíku jako vedlejší produkt biosyntézy ethylenu v listech a plodech.

Hladiny kyanovodíku (HCN) v hořkých mandlích (*Prunus amygdalus* var. *amara*) jsou přibližně 40krát vyšší než hladiny naměřené v mandlích sladkých (*Prunus amygdalus* var. *dulcis*) (Ballhorn 2011). Předpokládá se, že je to z důvodu množství obsaženého amygdalinu. V hořkých mandlích je ho více a po enzymatické hydrolýze dochází k uvolnění vysoké hladiny kyseliny kyanovodíkové a benzaldehydu, který navozuje hořkost (Dicenta et al. 2002).

Chaouali et al. (2013) analyzovali množství kyanovodíku v meruňkových jádrech získaných z odlišných oblastí Tuniska, po kterých byly jednotlivé vzorky pojmenovány (Monastir, Sfax, Sbiba, Morneg a Tastour). Úrovně HCN se u vzorků značně liší. Nejnížší hodnoty byly zjištěny u vzorků „Sfax“ (583,2 mg/kg) a „Tastour“ (540 mg/kg). Tyto regiony se nachází na severozápadě a jihovýchodě. Střední hodnota byla naměřena u vzorku „Sbiba“ (804,60 mg/kg), jenž pocházel ze středního Tuniska. Vzorky „Monastir“ (1134 mg/kg) ze středovýchodu a „Morneg“ (1193,40 mg/kg) ze severu země měly nejvyšší hodnoty naměřeného kyanovodíku. Množství kyanidu v jádrech meruněk se pohybuje od 0,05 do cca 4 mg/g, průměrnou hladinou je 0,5 mg kyanidu. Hladiny kyanidu ale mohou být ovlivněny různými faktory, jako například kultivačními postupy, odrůdou, obsahem vlhkosti a tak dále (Ballhorn 2011). Podle Výboru pro toxicitu chemických látek v potravinách, spotřebních výrobcích a životním prostředí (COT) ve Velké Británii, mohou koncentrace kyanidu v meruňkových jádrech dosáhnout 2 000 mg/kg sušiny (Chaouali et al. 2013)

Ohledně obsahu kyanovodíku v jádrech broskve (*Prunus persica*) je obecně známo, že je nižší než v jádrech hořkých mandlí nebo meruněk. Množství kyanovodíku se pohybuje od 0,4 do 2,6 mg/g (Ballhorn 2011).

Šlechtitelé se již zaměřili i na problematiku kyanogenních rostlin. Dnes už lze zakoupit vysoce kyanogenní rostliny v kultivarech nízkou kyanogenních (Ballhorn 2011).

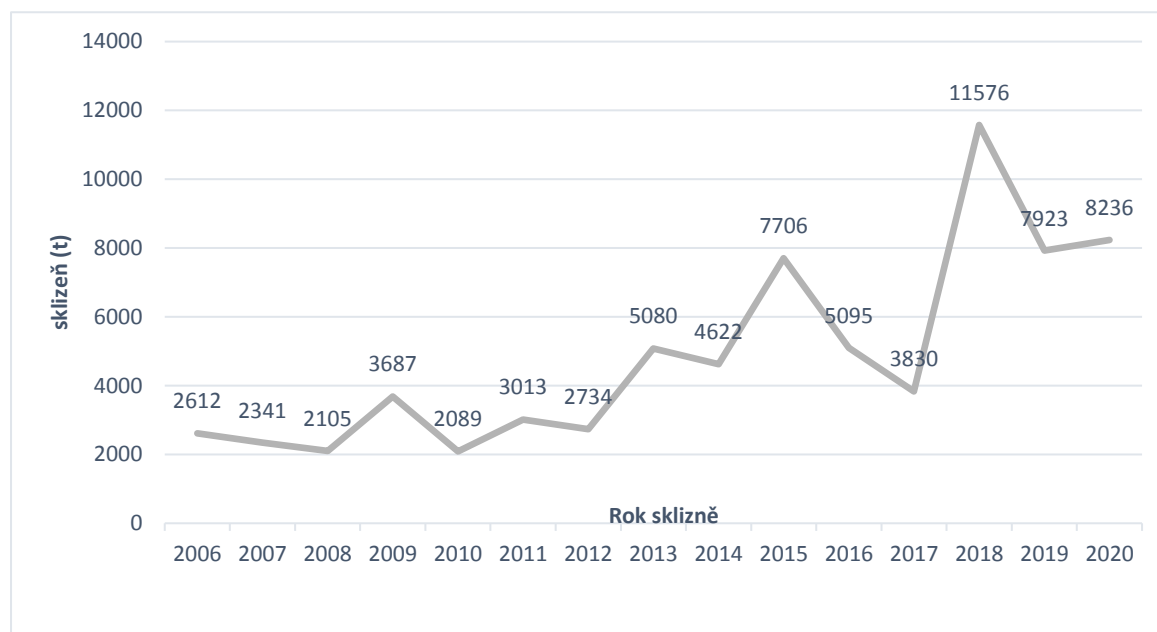
3.5 Slivoň švestka (*Prunus domestica*)

Druh slivoň švestka (*Prunus domestica*), někdy také uváděna jako evropská švestka či švestka domácí, se řadí do čeledi růžovitých (*Rosaceae*), rodu slivoň (*Prunus*). Pod tento druh peckovin spadají evropské slívy a švestky.

Místo původu této dřeviny zatím nebylo určeno, ale předpokládá se, že by jednou možností původu mohla být východní část Evropy, pravděpodobně v oblasti Balkánského poloostrova. Další možností původu je pohoří Kavkaz, poblíž Kaspického moře v západní Asii (Rieger 2006). První známky domestikace švestky se objevují v prvním tisíciletí před naším letopočtem (Zohary et al. 2012). Ale dle Rieger (2006) se v Evropě pěstuje téměř 2000 let. Jde o hexaploidní rostlinu, díky čemuž se odhaduje, že je výsledkem samovolné hybridizace diploidní slivoně myrobalán (*Prunus cerasifera*) s tetraploidní trnkou obecnou (*Prunus spinosa*). Buďto došlo k následnému spontánnímu zdvojnásobení chromozomů anebo druh vznikl jako produkt neredukovaných gamet obou rodičů. První evropskou odrůdou švestek

získanou řízenou hybridizací byla „The Czar“, kterou vyšlechtil Thomas Rivers v Anglii křížením „Prince Engelbert“ a „Rivers Early Pacific“ v roce 1843, ale byla představena až v roce 1873 (Hartmann & Neumüller 2008).

Světová produkce švestek se v posledních letech mírně zvyšuje. V roce 2018 dosáhla přibližně 12,6 milionů tun. Dle měřítka produkce se švestky umístily na 7. místě mezi nejvíce pěstovaným ovocem (FAO 2021). Podle Českého statistického úřadu (ČSÚ) bylo v roce 2020 v České republice sklizeno 8236 tun švestek a pološvestek. Zároveň bylo zaznamenáno, že se sklizeň těchto plodů za poslední roky zvýšila (viz Obrázek 2).



Obrázek 2 - Přehled sklizni švestek v ČR v jednotlivých letech (upraveno podle Českého statistického úřadu 2021)

3.5.1 Čeleď růžovité (*Rosaceae*)

Čeleď růžovitých je zastoupena stromy, keři a množstvím vytrvalých bylin. Druhy spadající do této čeledi se geograficky vyskytují od mírných oblastí až po polární. Odhaduje se, že zahrnuje až 100 rodů a okolo 2000 druhů (Litz 2004). Mimo slivoň (*Prunus*), sem patří také rody jabloň (*Mallus*), hrušeň (*Pirus*), kdouloň (*Cydonia*), jeřáb (*Sorbus*), maliník (*Rubus*), mišpule (*Mespilus*) a růže (*Rosa*) (Blažek et al. 2001).

3.5.2 Rod slivoň (*Prunus*)

Tento rod je považován za nejvýznamnější rod v oblasti ovocnářství. Řadí se do něj 77 druhů, z toho 10 druhů je pěstováno pro získávání ovoce. Rod slivoň se dále klasifikuje do 5 podrodů a 8 sekcí. Druh slivoň švestka patří do poddruhu *Prunophora* a sekce *Euprunus*, kam patří také slivoň myrobalán (*Prunus cerasifera*) a ze zahraničí například druhy *Prunus institia*, *Prunus salicina* a *Prunus simmoni* (Blažek et al. 2001). Slivoň švestka (*Prunus domestica*) je společně s japonskou švestkou (*Prunus salcina*) obchodně nejvýznamnějším druhem švestek. Jejich výživové údaje jsou si velmi podobné (Igwe & Charlton 2016).

3.5.3 Popis slivoně švestky

Stromy bývají vyššího vzpřímeného vzrůstu, nejvíce dorůstají do výšky 10–12 m. Jednoduché ozubené listy jsou poměrně velké (3–8 cm), vejčitého až eliptického tvaru a na povrchu jemné nebo hrubé (Roussos et al. 2015). Zatímco na spodní straně jsou listy lysé a matně zelené, na vrchní straně jsou hustě pokryty chloupky nebo téměř lysé. Slivoně švestka kvete velkými bílými květy o pěti okvětních lístcích. Květy lze většinou zahlédnout ve shlucích po dvou až třech, často i s listy (Press & Emberson 2016).

Plody jsou 2–8 cm dlouhé jednosemenné peckovice s dužnatým oplodím. Vyznačují se velkou variabilitou. Mohou být tvaru subglobálního či oválného a oviněná slupka se pohybuje v odstínech od zelené, přes žlutou a červenou, až po fialovou barvu. Dužina je zelená až žlutá (Roussos et al. 2015). Uvnitř plodu se nachází pecka, jejíž tvar a povrch se liší podle odrůdy (Blažek et al. 2001). Chuťově mohou být švestky sladké až mírně kyselé a textura není pro všechny jednotná (Roussos et al. 2015).

Pomologicky se kulturní odrůdy slivoně švestky rozdělují podle vlastností plodu, vzrůstnosti, habitu stromu a znaků, na švestky pravé, pološvestky, slívy, renklódy a mirabelky (Kutina et al. 1991). Pravé švestky mají podlouhle oválné plody se špičatými konci. Barva plodů bývá modrá nebo fialová, až červeně nebo tmavě modrá, se světle modrým oviněním. Slívy mají kulovitý tvar plodů s červenomodrou až tmavěmodrou slupkou a šedomodrým oviněním. Pro renklódy jsou typické kulaté oviněné plody v odstínech zelenožluté až červenomodré nebo červenohnědé barvy. Mirabelky jsou známé menšími plody, velikostně podobnými třešním. Jejich slupka je v plné zralosti zlatožlutá (Oberbeil & Lenzová 2001).

3.5.4 Složení švestek

Čerstvé plody obsahují 0,7 g bílkovin, 0,28 g tuků, 11,42 g sacharidů, 9,92 g cukrů a 1,4 g vlákniny na 100 g (USDA 2020). Oproti tomu Stacewicz-Sapuntzakis et al. (2001) uvádí průměrný obsah sacharidů v čerstvých švestkách 19 g/100g. Z toho glukóza tvořila průměrně 31 %, fruktóza 18 %, sacharóza 23 % a sorbitol 28 %. Obsah sacharidů může záviset na stupni zralosti plodu.

Obsah minerálních látek v plodech částečně záleží na půdě, ve které jsou ovocné stromy pěstovány (Stacewicz-Sapuntzakis et al. 2001) a jejich koncentrace se zvyšuje s dozráváním plodů (Arion et al. 2014). Makroelementy jsou ve 100 g čerstvých švestek zastoupeny vápníkem (6 mg), hořčíkem (7 mg), fosforem (16 mg) a draslíkem (157 mg). Dále byly také naměřeny některé mikronutrienty jako železo (0,17 mg), zinek (0,1 mg) a měď (0,057 mg) (USDA 2020).

Různé studie ukázaly, že peckové plody jsou obzvláště bohaté na důležité fytochemikálie, které představují mimořádný přínos pro jejich aroma a chuť (Lara et al. 2020). Švestky jsou považovány za ovoce s vysokým množstvím bioaktivních látek, jako jsou vitaminy (A, C a E), karotenoidy, antokyany a další rostlinné fenoly, které přispívají k antioxidační schopnosti (Stacewicz-Sapuntzakis et al. 2001). Švestky jsou známé pro různé fenolické sloučeniny obsahující kyselinu hydroxyskořicovou, flavonoly a antokyany. Fenoly obsažené ve švestkách

jsou z většiny zastoupeny kofeoylchinovými kyselinami, přesněji neochlorogenovou (73 %) a chlorogenovou (13 %). Méně zastoupené jsou potom antokyany (7 %), flavan-3-ol katechin (5 %) a flavonol rutin (2 %) (Hall & Tokusoglu 2011). Kvalitativní a kvantitativní obsah biologicky aktivních sloučenin v plodech švestek se může značně lišit v závislosti na kultivarech (Liaudanskas et al. 2020). Antokyany se nacházejí v čerstvých švestkách z velké části hlavně jako deriváty rutinoidů, jako je kyanid-3-rutinosid, kyanidin-3-glukosid a peonidin 3-rutinosid (Lara et al. 2020). Z karotenoidů obsahují švestky neoxanthin, lutein a violaxanthin (Biehler et al. 2012).

Liaudanskas et al. 2020 se zaměřili na variabilitu složení fenolických sloučenin ve švestkách vypěstovaných v Litvě. Během analýzy byly detekovány glykosidy skupiny flavonolů jako aviklinin, isorhamnetin-3-rutinosid, isoquercitrin, hyperosid, rutin a aglykon kvercetin. Celkové množství fenolů se pohybovalo v rozmezí 160.41 až 714.99 $\mu\text{g/g}$ (suché hmotnosti), kdy nejnižší hodnota byla naměřena u kultivaru Violeta a nejvyšší u kultivaru Herman.

3.5.5 Význam švestek ve výživě člověka

Plody jsou po sklizni určeny buď k přímé spotřebě anebo se dále zpracovávají. Mezi produkty ze švestek patří například pálenky, džemy a sušené ovoce (Janakiev et al. 2020).

Terapeutická a profylaktická hodnota švestek je známa již od starověku. Mají mineralizující, odkyselující, projímavé a močopudné účinky (Butac 2020). Švestky jsou dobrým zdrojem přírodních antioxidantů a jejich antioxidační účinky jsou vyšší než třeba u pomerančů, jahod či jablek. Ovšem antioxidační schopnost ovoce a zeleniny je ovlivněna různými faktory, například kultivarem, dobou zrání, podmínkami a dobou skladování. Podzimní odrůdy vykazovaly vyšší antioxidační schopnost, než tomu bylo u letních (Arion et al. 2014).

Švestkové plody podporují látkovou přeměnu sacharidů v těle. Účinně posilují srdeční činnost a funkci imunitního systému. Můžou učinit organismus odolnější vůči stresu, neboť napomáhají při nervovém vypětí a problémech se soustředěním (Oberbeil & Lenzová 2001).

3.5.6 Tržní odrůdy

Důležitými šlechtitelskými cíli jsou kombinace vysokého výnosu a kvality plodů, samosprašnost, přizpůsobení se klimatu, prodloužení doby zrání a rezistence proti švestkovým chorobám, jako je například šarka. Některé z novějších odrůd už jsou tolerantní k této chorobě. První takovou odolnou odrůdou je „Jojo“. Vedoucí pozici ve šlechtění švestek *Prunus domestica* náleží Německu (Hartmann & Neumüller 2008) díky dvěma šlechtitelským programům na univerzitách v Hohenheimu a Geisenheimu (Blažek & Pištěková 2009). Také v mnoha ostatních evropských zemích je vyvíjeno velké množství šlechtitelských programů. V České republice vede šlechtitelskou a výzkumnou činnost Výzkumný a šlechtitelský ústav pomologie, jenž se nachází v Holovousech. Mezi české odrůdy patří například „Amátka“, „Dwarf“, „Kamír“, „Těchobuzická a další (Butac 2020).

Variabilitu odrůd lze pozorovat také na vzhledu plodu, jako je barva slupky či dužiny, tvar a velikost plodu, pecky či jádra (viz Obrázek 3 a 4).

3.5.6.1 Čačanská lepotica

Odrůda Čačanská lepotica pochází z bývalé Jugoslávie, kde byla roku 1961 vyšlechtěna ve Výzkumném ústavu ovocnářské v Čačaku. Vznikla křížením odrůd Wangenheimova a Požegača. Pomologicky se zařazuje mezi pološvestky (Kutina et al. 2001). Plody jsou velké, tmavě modré barvy a silně ojíněné. Doba zrání nastává v polovině srpna, ale období sklizňové zralosti je poměrně krátké a pokud dojde k přezrání, snižuje se kvalita plodů. Proto je Čačanská lepotica odrůdou hlavně pro přímou spotřebu (Blažek et al. 2001). Je používána jako rodič v různých šlechtitelských programech (Butac 2020).

3.5.6.2 Jojo

Odrůda „Jojo“ se pomologicky zařazuje mezi pološvestky. Pochází z Německa, kde byla roku 1996 (Hartmann & Neumüller 2008) vyšlechtěna křížením odrůd „Ortenauer“ a „Stanley“ (Butac 2020). Dozrívá koncem srpna. Plody jsou velké, fialovomodré barvy a ojíněné. Vůči virové chorobě šarce je tato odrůda odolná (Jan 2020).

3.5.6.3 Elena

„Elena“ je též odrůdou z Německa. Byla registrována roku 2005. Vznikla zkřížením odrůd „Vlaška“ a „Stanley“ (Vysloužil 2015). Z hlediska pomologie se jedná o pološvestku, která dozrívá později. Plody má střední velikosti, fialovomodré s ojíněním (Jan 2020).

3.5.6.4 Presenta

Odrůda, která vznikla roku 1981 v Německu (Hartmann & Neumüller 2008) křížením odrůd „Ortenauer“ a „President“ (Butac 2020). Plody jsou středně velké, fialovomodré a ojíněné. Dozrívá v druhé polovině září (Jan 2020).

3.5.6.5 Valjevka

Tato odrůda vznikla roku 1965 v bývalé Jugoslávii (Hartmann & Neumüller 2008). Jde o křížence odrůd „d'Agen 707“ a „Stanley“ (Butac 2020). Pomologicky se řadí mezi pološvestku, která má tmavě modré velké plody. Proti šarce je odolná (Jan 2020).

3.5.6.6 Tophit

„Tophit“ je odrůdou, jenž vznikla v roce 1988 v Německu z odrůd „Čačanská lepotica“ a „President“ (Vysloužil 2015). Pomologie ji zařazuje mezi pološvestky. Tato odrůda je pozdní a plodí velké plody (Hartmann & Neumüller 2008).

3.5.6.7 Topper

Jedná se o odrůdu původem z Německa, která vznikla roku 1985 jako hybrid odrůd „Čačanská najbolja“ a „Auerbacher“. I „Topper“ je podle pomologie pološvestka (Hartmann & Neumüller 2008). Zraje na začátku až do poloviny září. Plody jsou střední velikosti a tmavě modré barvy (Vysloužil 2015).

3.5.6.8 Haganta

Odrůda, jenž vznikla v Německu po zkřížení odrůd „Čačanská najbolja“ a „Valor“ (Vysloužil 2015). Z hlediska pomologie je „Haganta“ pološvestkou. Sklizeň probíhá v polovině září. (Hartmann & Neumüller 2008) a plody jsou velké, fialovomodré s ožíněním (Vysloužil 2015).

3.5.6.9 Toptaste

Tato odrůda je původem z Německa, vznikla roku 1994 po zkřížení odrůd „Domáci velkoplodá“ a „Valor“. Jde o pozdní odrůdu s poměrně velkými plody (Vysloužil 2015). Pomologicky se řadí mezi pološvestky (Butac 2020).

3.5.6.10 Tepend

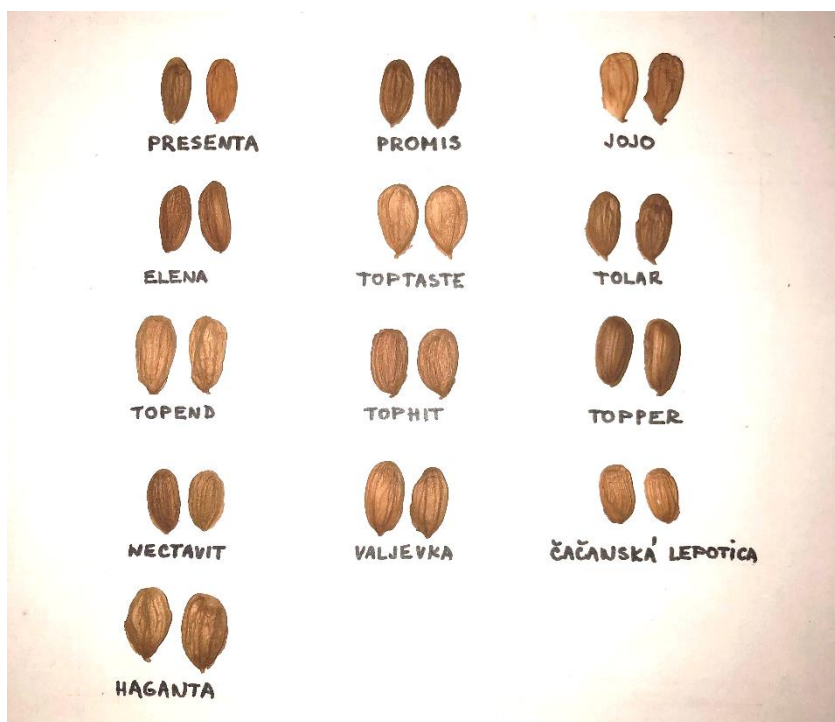
„Tepend“ je odrůdou, která vznikla roku 1994 v Německu z odrůd „Čačanska najbolja“ a „Valor“ (Butac 2020). Má velké plody fialovomodré barvy (Vysloužil 2015).

3.5.6.11 Promis

Tato odrůda byla zaregistrována Polsku (Butac 2020).



Obrázek 3 - Přehled variability pecek u jednotlivých odrůd



Obrázek 4 - Přehled variability jader jednotlivých odrůd

4 Metodika

Cílem této diplomové práce bylo stanovení amygdalinu v semenech různých odrůd slivoně švestky a vyhodnotit, zda se množství amygdalinu v odrůdách liší. Obsah amygdalinu byl stanoven vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s detekcí diodovým polem (HPLC/DAD) a kapalinovou chromatografií s hmotnostním spektrometrem (LC/MS).

4.1 Rostlinný materiál

V diplomové práci byly analyzovány plody třinácti odrůd slivoně švestky. Jednalo se o odrůdy „Čačanská lepotica“, „Elena“, „Haganta“, „Jojo“, „Nectavit“, „Presenta“, „Promis“, „Tolar“, „Tepend“, „Tophit“, „Topper“, „Toptaste“ a „Valjevka“. Plody odrůdy „Čačanská lepotica“ pocházely ze soukromé zahrady v Poříčí nad Sázavou. Plody ostatních odrůd byly sklizeny v Demonstrační a výzkumné stanici v Praze Troji Fakulty agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, patřící pod Českou zemědělskou univerzitu v Praze.

Plody švestek byly sklizeny v období od srpna do září roku 2020. Sklizeň probíhala postupně, jak jednotlivé odrůdy dosahovaly fáze zralosti (viz Tabulka 1). Bezprostředně po sklizni byly švestky ručně vypeckovány a získané pecky byly následně rozprostřeny na čisté tácy a přirozeně sušeny při pokojové teplotě (18-24 °C). Během sušení byly dvakrát pecky rukou promíchávány, aby došlo k rovnoměrnému usušení. Sušení trvalo měsíc. Po usušení byly pecky za pomoci louskáčku na ořechy rozlousknuty, odstraněn endokarp (skořápka), aby nebylo poškozeno jádro uvnitř. Získaná jádra byla uložena do uzavíratelných, vzduchotěsných sáčků a skladována při pokojové teplotě v temnu.

Tabulka 2 - Přehled datumů sklizni odrůd

Odrůda	Datum sklizně
Čačanská lepotica	14.8.2020
Elena	7.9.2020
Haganta	26.8.2020
Jojo	26.8.2020
Nectavit	7.9.2020
Presenta	22.9.2020
Promis	7.9.2020
Tolar	7.9.2020
Tepend	7.9.2020
Tophit	7.9.2020
Topper	2.9.2020
Toptaste	1.9.2020
Valjevka	1.9.2020

4.2 Pístroje

Pro úpravu vzorků před samotnou analýzou byly použity tyto pístroje:

- mlýnek IKA A 11 basic Analytical mill (Janke & Kunkel Co., Staufen, Německo)
- vodní lázeň (GFL, Německo)
- Soxhletův extraktor
- rotační vakuová odparka BÜCHI Rotavapor, (BÜCHI Laboraltechnik AG, Švýcarsko)
- vortex
- centrifuga 5810R, (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- pístroj na přípravu redestilované vody GFL 2104 (GFL, Německo)
- pístroj na přípravu deionizované vody (Millipore, Francie)
- kapalinový chromatograf UltiMate 3000 RS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- hmotnostní spektrometr 3200 QTRAP s trojitým kvadrupólem a elektrosprejovou ionizací (ESI) (Sciex, Framingham, MA, USA)
- chromatografický systém HPLC, Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
 - vysokotlaká kvartérní pumpa Ultimate 3000
 - autosampler Ultimate 3000
 - detektor diodového pole (DAD) Ultimate 3000
 - termostat kolon Ultimate 3000

4.3 Pomůcky

V praktické části této diplomové práce byly pro přípravu vzorku k analýze použity následující pomůcky:

- běžné laboratorní sklo (varné baňky, kádinky atd.)
- analytické váhy (Kern&Sohn GmbH, Německo)
- váhy s přesností na 3 a 4 desetinná místa (Kern&Sohn GmbH, Německo)
- laboratorní lžička
- zkumavka Eppendorf 15 ml
- pipety (Socorex Acura, Švýcarsko)
- injekční jehla
- injekční jednorázové stříkačky Luer-Slip (3 ml), (Fischer Scientific, Německo)
- jednorázové plastové kyvety 45 ml, Plastibrand (GmbH, Německo)
- membránový mikrofiltr (PVDF, 0,22 μm)
- HPLC vialky (2 ml), (VT0098M-1232, Německo)
- filtrační papír (VWR, Německo)
- membránový filtr Nylon (13 mm, 0,2 μm), (Agilent Technologies, Čína)

4.4 Chemikálie

- Ethanol – čistota 96 % (Lachner, Česká republika)
- Diethylether p.a. stabilizovaný (Lachner, Česká republika)
- Methanol p.a. (Lachner, Česká republika)
- Deionizovaná voda (Millipore, Francie)
- Redestilovaná voda (GFL, Německo)
- N₂
- Standard: Amygdalin – čistota ≥ 97%, BioXtra (Sigma Aldrich)

4.5 Příprava vzorků

Sušená jádra švestek byla před extrakcí homogenizována rozemletím v mlýnku na hrubší prášek. Do 500 ml varné baňky byl navážen 1 g vzorku, který se zalil 50 ml ethanolu a byl přidán varný kamínek. Vzorek byl poté extrahován ve vodní lázni pod zpětným chladičem po dobu 100 minut při teplotě bodu varu ethanolu (78,6 °C). Extrakce všech vzorků byly prováděny v triplikátu.

Po vychladnutí byly vzorky filtrovány přes Whatmanův filtr č.1 do kádinky. Vzorek byl následně odpařován na rotační vakuové odparce (45 °C, 7 mbar) pro odpaření ethanolu do sucha. Po tomto procesu bylo k suchému vzorku přidáno 10 ml diethyletheru a směs byla při pokojové teplotě promíchána za pomoci vířivé míchačky 1 minutu, aby mohlo dojít k vysrážení amygdalinu. Zbytek diethyletheru byl odpařen za pomoci dusíku. Sraženina amygdalinu byla rozpuštěna v 5 ml deionizované vody. Alikvotní část (4,5 ml) byla převedena do 15 ml zkumavky Eppendorf a ta vložena do velké odstředivky pro tyto zkumavky. Odstředování bylo nastaveno na 15 minut, při pokojové teplotě a odstředivé síle 16 000 x g. Vzniklý supernatant v množství 1 ml byl odebrán injekční jehlou a potom přefiltrován přes membrnový mikrofiltr (PVDF, 0,22 µm) do vialky. Takto připravené vzorky byly uloženy v temnu při teplotě 5 °C do té doby, než byla provedena analýza amygdalinu.

4.6 Stanovení amygdalinu metodou HPLC

4.6.1 Podmínky analýzy

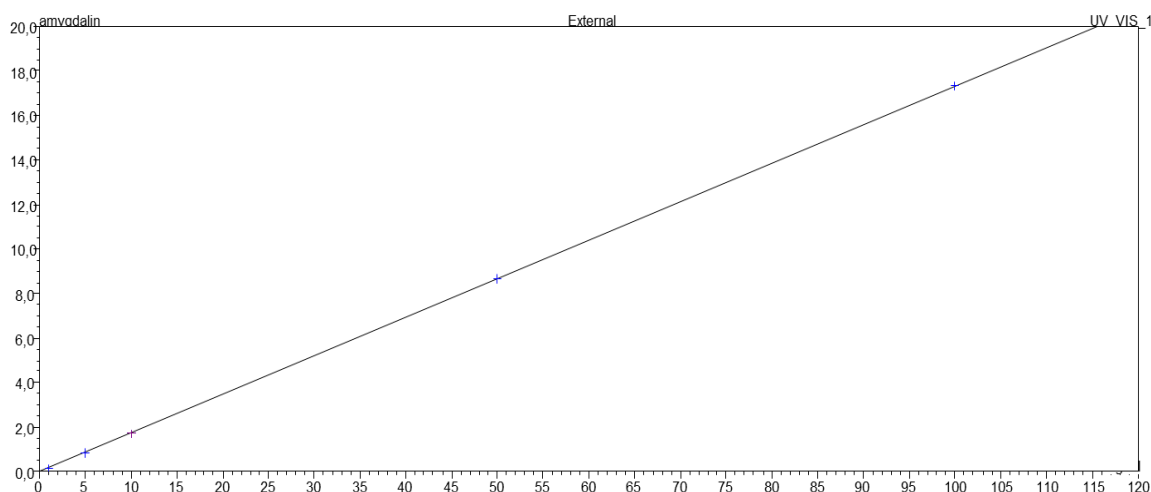
- | | |
|-------------------------|--|
| • Složení MF | methanol:deioniz. H ₂ O (25:75) |
| • Rychlost průtoku MF | 0,8 ml/min |
| • Eluce | isokratická |
| • Teplota chrom. kolony | 40 °C |
| • Nástřik | 10 µl |
| • Délka analýzy | 15 min |
| • Detekce | DAD, λ = 215 nm |

4.6.2 Kolona

- Nova-Pak® C18 4 µm (120 A, 3,9 x 150 mm), (Waters. Irsko)

4.6.3 Kalibrace

Pro kvantifikace amygdalinu byla vytvořena pětibodová kalibrační křivka v rozpětí 1–100 µg/ml (1, 5, 10, 50, 100), jenž je znázorněna na obrázku č. 5.



Obrázek 5 - Kalibrační křivka amygdalinu

4.7 Stanovení amygdalinu metodou LC/MS

4.7.1 Podmínky detekce

- Ionizace ESI + - pozitivní ionizační mód
- Skenovací režim Full scan – 100-2000 Da
- Přímá infúze 10 µl/min roztoku vzorku o koncentraci 100 µg/ml (optimalizace MRM přechodů)
- Objem nástřiku 5 µl
- Ion Spray Voltage IS = 5500 V
- Curtain gas CUR = 35 psi
- Collision gas CAD = medium
- Temperature TEM = 450 °C
- Ion source gas 1 GS1 = 30 psi
- Ion source gas 2 GS2 = 30 psi

4.7.2 Kolona

- Phenomenex Kinetex® 2.6 µm Phenyl-Hexyl 100 Å LC Column 50 x 3.0 mm, Ea

4.7.3 Chromatografická kolona a podmínky

- Teplota kolony 40 °C
- Průtok kolonou 350 µl/min
- Doba analýzy 7 min
- Objem nástřiku 5 µl
- Slabý promývací roztok Deionizovaná voda/ methanol (90/10)
- Silný promývací roztok Methanol
- Mobilní fáze A 0,1% kyselina mravenčí v deionizované vodě
- Mobilní fáze B 0,1% kyselina mravenčí v methanolu
- Průtok mobilní fáze 0,35 ml/min
- Gradient mobilní fáze 0 min (10 % B) – 2 min (100 % B) – 3 min (100 % B) – 4,1 min (10 % B) – 6 min (10 % B)

5 Výsledky

Ve vzorcích jader švestkových odrůd „Čačanská lepotica“, „Elena“, „Haganta“, „Jojo“, „Nectavit“, „Presenta“, „Promis“, „Tolar“, „Topend“, „Tophit“, „Topper“, „Toptaste“ a „Valjevka“ byl stanoven obsah amygdalinu. Od každé odrůdy byly vytvořeny tři vzorky za účelem přesnějších výsledků a pro případné zjištění chyby v měření. Naměřené výsledky jsou vyjádřeny v jednotkách mg/g DW (suché hmotnosti).

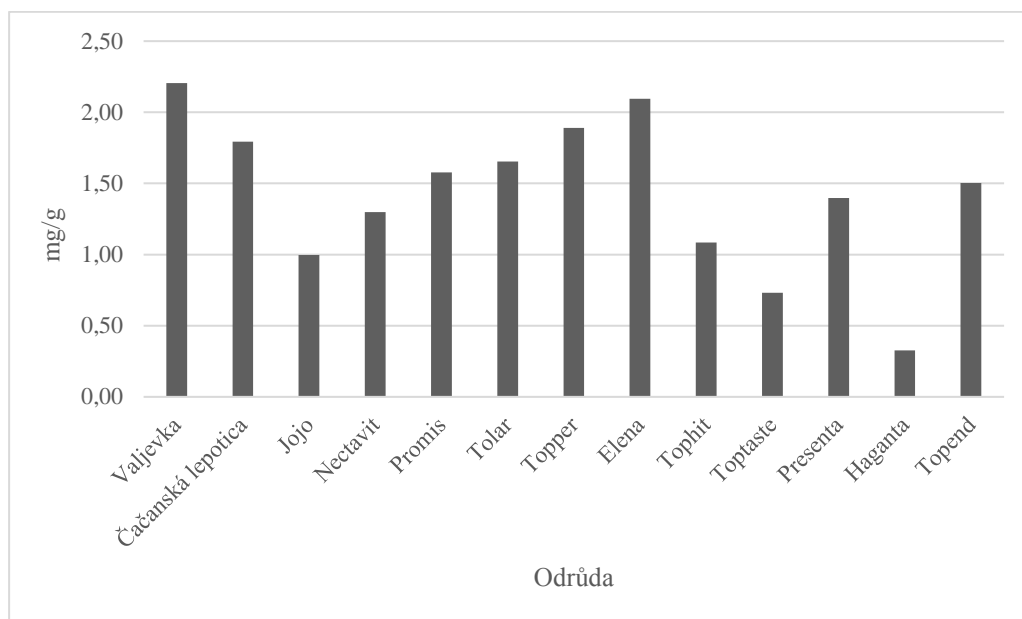
Výsledky jsou znázorněny a statisticky zpracovány v tabulkách a grafech vytvořených v programu Microsoft Excel a StatSoft Statistica.

5.1 Vyhodnocení amygdalinu HPLC/DAD

Jak již bylo zmíněno, od každé odrůdy byly měřeny tři vzorky. Naměřené hodnoty amygdalinu tří vzorků stejné odrůdy byly vždy zprůměrovány. Průměrné koncentrace v jádrech jednotlivých odrůd jsou zaznamenány v tabulce č. 3. Obsah amygdalinu ve švestkových jádrech byl naměřen v rozmezí od 0,33 mg/g sušiny do 2,2 mg/g sušiny. Nejvyšší obsah byl zjištěn v jádrech odrůdy „Valjevka“ (2,2 mg/g), následovala „Elena“ (2,1 mg/g), „Topper“ (1,89 mg/g), „Čačanská lepotica“ (1,79 mg/g), „Tolar“ (1,65 mg/g), „Promis“ (1,58 mg/g), „Topend“ (1,5 mg/g), „Presenta“ (1,4 mg/g), „Nectavit“ (1,3 mg/g), „Tophit“ (1,08 mg/g), „Jojo“ (1 mg/g), „Toptaste“ (0,79 mg/g) a nejnižší koncentrace byla zjištěna v odrůdě „Haganta“ (0,33 mg/g). Grafické znázornění koncentrací je na obrázku č.6.

Tabulka 3 - Průměrné koncentrace a směrodatné odchyly amygdalinu u metody HPLC/DAD

Odrůda	mg/g	Směrodatná odchylna
Valjevka	2,20	0,31
Čačanská lepotica	1,79	0,34
Jojo	1,00	0,15
Nectavit	1,30	0,06
Promis	1,58	0,09
Tolar	1,65	0,07
Topper	1,89	0,25
Elena	2,10	0,51
Tophit	1,08	0,09
Toptaste	0,73	0,08
Presenta	1,40	0,14
Haganta	0,33	0,22
Topend	1,50	0,19



Obrázek 6- Grafické znázornění průměrné koncentrace amygdalinu v závislosti na odrůdě (HPLC)

Dle tabulky č. 4 byla celková průměrná koncentrace amygdalinu ve švestkových jádrech 1,43 mg/g. Směrodatná odchylka byla $\pm 0,539$. Průměrná kvadratická odchylka mezi koncentracemi a jejich aritmetickým průměrem byla 0,29. Variační koeficient byl 37,8 %.

Tabulka 4 - Popisné statistiky amygdalinu všech odrůd (metoda HPLC)

Proměnná	Popisné statistiky (Statistika do DP)							
	N platných	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	Rozptyl	Sm.odch.	Var.koef.
Průměr. koncentrace amygdalinu	13	1,427294	1,503920	0,326149	2,204567	0,291006	0,539450	37,79530

Z analýzy rozptylu (viz Tabulka č. 5) je zřejmé, že je mezi skupinami statisticky významný rozdíl a koncentrace amygdalinu závisí na odrůdě. Pro podrobnější vyhodnocení byl proveden Scheffeho test (viz Tabulka č. 6). Na základě tohoto testu byly stanoveny statisticky významné rozdíly mezi odrůdami „Valjevka“ a „Toptaste“, „Valjevka“ a „Haganta“, „Tolar“ a „Haganta“, „Topper“ a „Toptaste“, „Topper“ a „Haganta“ a „Elena“ a „Haganta“.

Tabulka 5 - Analýza rozptylu pro HPLC/DAD metodu

Proměnná	Analýza rozptylu (Statistika do DP (1))							
	SČ efekt	SV efekt	PČ efekt	SČ chyba	SV chyba	PČ chyba	F	p
Koncentrace	8,172437	12	0,681036	2,051872	26	0,078918	8,629655	0,000003

Tabulka 6 - Scheffeho test pro HPLC/DAD metodu

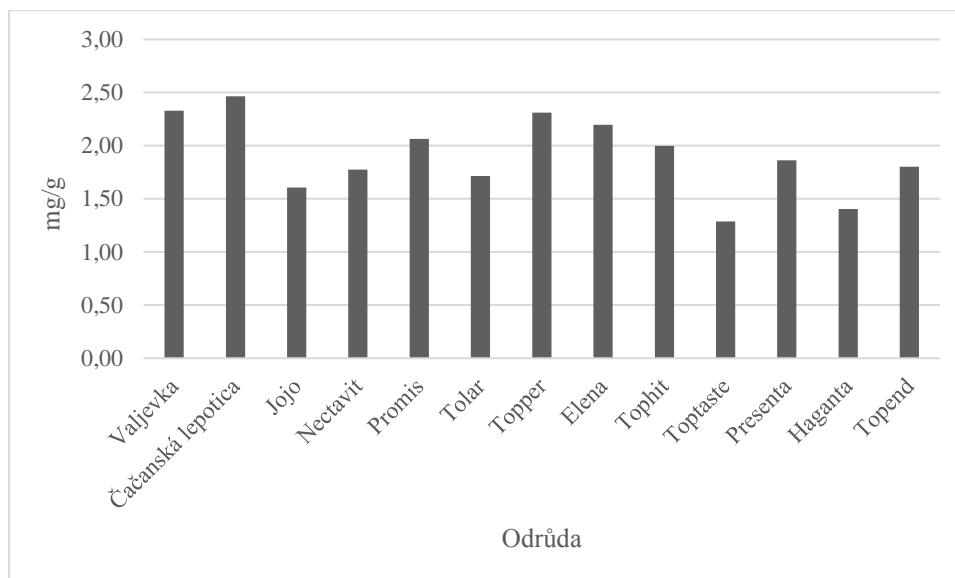
Odrůda	Scheffeho test; proměn: Koncentrace (Statistika do DP (1)) Označ. rozdily jsou významné na hlad. p < ,05000												
	{1} M=1,9871	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}
Valjevka {1}		0,990585	0,085457	0,691025	0,990062	0,998464	1,000000	0,999990	0,282126	0,024827	0,861921	0,002601	0,824883
Čačanská leptotica {2}	0,990585		0,701103	0,99719	1,000000	1,000000	0,969515	0,999992	0,955843	0,374254	0,999998	0,070580	0,999990
Jojo {3}	0,085457	0,701103		0,991562	0,706121	0,551692	0,053857	0,307649	0,999996	0,999999	0,950657	0,983972	0,966226
Nectavit {4}	0,691025	0,99719	0,991562		0,99744	0,997259	0,561894	0,962564	0,999985	0,890844	1,000000	0,394587	1,000000
Promis {5}	0,990062	1,000000	0,706121	0,99744		1,000000	0,968218	0,999990	0,957496	0,378954	0,999998	0,071913	0,999991
Tolar {6}	0,998464	1,000000	0,551692	0,997259	1,000000		0,992422	1,000000	0,887983	0,254306	0,999900	0,040770	0,999733
Topper {7}	1,000000	0,969515	0,053857	0,561894	0,968218	0,992422		0,999827	0,195615	0,014882	0,760611	0,001503	0,713494
Elena {8}	0,999990	0,999992	0,307649	0,962564	0,999990	1,000000	0,999827		0,674318	0,113738	0,994442	0,014647	0,990293
Tophit {9}	0,282126	0,955843	0,999996	0,999985	0,957496	0,887983	0,195615	0,674318		0,997426	0,999162	0,810412	0,999639
Toptaste {10}	0,024827	0,374254	0,999999	0,890844	0,378954	0,254306	0,014882	0,113738	0,997426		0,734407	0,999814	0,780098
Presenta {11}	0,861921	0,999998	0,950657	1,000000	0,999998	0,999900	0,760611	0,994442	0,999162	0,734407		0,232485	1,000000
Haganta {12}	0,002601	0,070580	0,983972	0,394587	0,071913	0,040770	0,001503	0,014647	0,810412	0,999814	0,232485		0,268349
Topend {13}	0,824883	0,999990	0,966226	1,000000	0,999991	0,999733	0,713494	0,990293	0,999639	0,780098	1,000000	0,268349	

5.2 Vyhodnocení amygdalinu LC/MS

Stejně jako u HPLC/DAD metody i u metody LC/MS byly od každé odrůdy měřeny tři vzorky. Naměřené hodnoty amygdalinu trojice vzorků stejné odrůdy byly zprůměrovány. Průměrné koncentrace amygdalinu naměřené touto metodou jsou zaznamenány v tabulce č. 7. Z této tabulky a grafu na obrázku č. 7 lze vidět, že se množství amygdalinu liší v závislosti na odrůdě švestek. Nejvyšší průměrná koncentrace amygdalinu v jádrech švestky byla naměřena u odrůdy „Čačanská leptotica“ (2,46 mg/g), dále následovala „Valjevka“ (2,33 mg/g), „Topper“ (2,31 mg/g), „Elena“ (2,2 mg/g), „Promis“ (2,07 mg/g), „Tophit“ (2 mg/g), „Presenta“ (1,86 mg/g), „Topend“ (1,8 mg/g), „Nectavit“ (1,78 mg/g), „Tolar“ (1,71 mg/g), „Jojo“ (1,61 mg/g), „Haganta“ (1,4 mg/g) a s nejnižší koncentrací „Toptaste“ (1,29 mg/g). Koncentrace amygdalinu naměřené metodou LC/DS se pohybovaly v rozmezí od 1,29 mg/g sušiny po 2,46 mg/g sušiny.

Tabulka 7 - Průměrné koncentrace a směrodatné odchylky amygdalinu u metody LC/MS

Odrůda	mg/g	Směrodatná odchylka
Valjevka	2,33	0,42
Čačanská leptotica	2,46	0,21
Jojo	1,61	0,17
Nectavit	1,78	0,10
Promis	2,07	0,03
Tolar	1,71	0,08
Topper	2,31	0,12
Elena	2,20	0,06
Tophit	2,00	0,10
Toptaste	1,29	0,12
Presenta	1,86	0,04
Haganta	1,40	0,26
Topend	1,80	0,12



Obrázek 7 - Grafické znázornění průměrné koncentrace amygdalinu v závislosti na odrůdě (LC/MS)

Dle tabulky č. 8 byla celková průměrná koncentrace amygdalinu ve švestkových jádrech 1,91 mg/g. Směrodatná odchylka byla $\pm 0,361$. Průměrná kvadratická odchylka mezi koncentracemi a jejich aritmetickým průměrem byla 0,13. Variační koeficient byl 18,9 %.

Tabulka 8- Popisné statistiky amygdalinu všech odrůd (metoda LC/MS)

Proměnná	Popisné statistiky (Statistika do DP (1))							
	N platných	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	Rozptyl	Sm.odch.	Var.koef.
Průměrná koncentrace	13	1,909605	1,863266	1,287944	2,464972	0,130539	0,361301	18,92022

Z analýzy rozptylu v tabulce č. 9 je zřejmé, že je mezi skupinami statisticky významný rozdíl a koncentrace amygdalinu závisí na odrůdě. Pro podrobnější vyhodnocení byl proveden Scheffeho test (viz Tabulka č. 10). Na základě tohoto testu byly stanoveny statisticky významné rozdíly mezi odrůdami „Valjevka“ a „Toptaste“, „Valjevka“ a „Haganta“, „Jojo“ a „Toptaste“, „Topper“ a „Toptaste“, „Topper“ a „Haganta“, „Elena“ a „Toptaste“ a „Elena“ a „Haganta“

Tabulka 9 - Analýza rozptylu pro LC/MS metodu

Proměnná	Analýza rozptylu (Statistika DP)							
	SV	SV	PČ	SV	PČ	F	p	
Průměrná koncentrace	5,075781	12	0,422982	1,167419	26	0,044901	9,420373	0,000001

Tabulka 10 - Sheffeho test pro LC/MS metodu

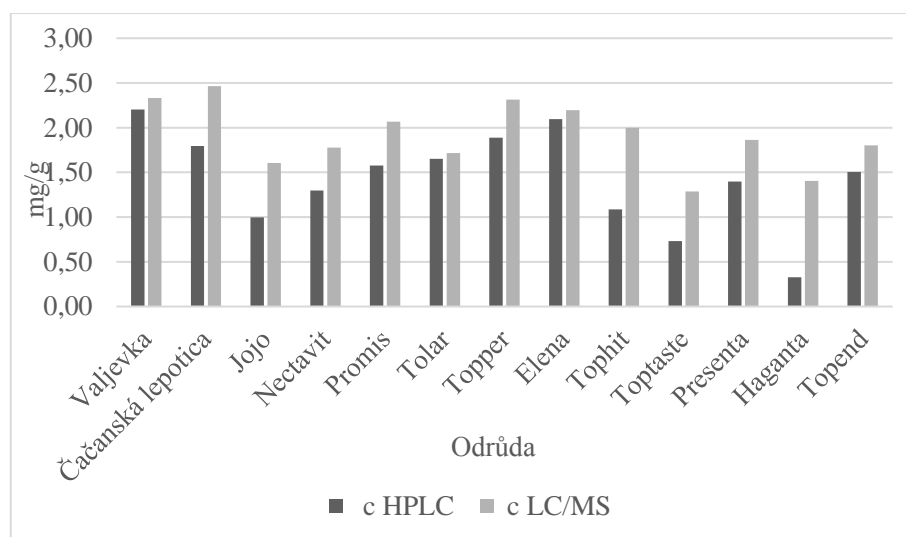
Odrůda	Scheffeho test: proměnná: Průměrná koncentrace (Statistika DP)												
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)
Valjevka {1}	M=2,3310	M=1,000000	M=1,4966	M=1,7762	M=2,0657	M=1,7150	M=2,3122	M=2,1966	M=1,9305	M=1,2879	M=1,8633	M=1,2263	M=1,8034
Čačanská lepotica {2}	1,000000	1,000000	0,076758	0,596622	0,997491	0,432152	1,000000	0,999998	0,927800	0,008732	0,815100	0,004376	0,670123
Jojo {3}	0,076758	0,082675	0,082675	0,618016	0,998109	0,452467	1,000000	0,999999	0,936884	0,009523	0,831371	0,004782	0,690747
Nectavit {4}	0,596622	0,618016	0,995914	0,995914	0,557213	0,999624	0,091559	0,244386	0,879429	0,999765	0,961244	0,997008	0,990708
Promis {5}	0,997491	0,998109	0,557213	0,994409	0,994409	1,000000	0,647522	0,900956	0,999991	0,769070	1,000000	0,609842	1,000000
Tolar {6}	0,432152	0,452467	0,999624	1,000000	0,972315	0,972315	0,927800	0,999999	0,999998	0,128983	0,999827	0,073136	0,997738
Topper {7}	1,000000	1,000000	0,091559	0,647522	0,998752	0,481249	1,000000	1,000000	0,948163	0,010740	0,852694	0,005407	0,718792
Elena {8}	0,999998	0,999999	0,244386	0,900956	0,999999	0,784584	1,000000	1,000000	0,997419	0,036830	0,981498	0,019297	0,936295
Tophit {9}	0,927800	0,936884	0,879429	0,999991	0,999998	0,999672	0,948163	0,997419	0,997419	0,366268	1,000000	0,236576	0,999999
Toptaste {10}	0,008732	0,009523	0,999765	0,769070	0,128983	0,890678	0,010740	0,036830	0,366268	0,366268	0,540419	1,000000	0,701754
Presenta {11}	0,815100	0,831371	0,961244	1,000000	0,999827	0,999994	0,852694	0,981498	1,000000	0,540419	1,000000	0,379664	1,000000
Haganta {12}	0,004376	0,004782	0,997008	0,609842	0,073136	0,767957	0,005407	0,019297	0,236576	1,000000	0,379664	1,000000	0,535433
Topend {13}	0,670123	0,690747	0,990708	1,000000	0,997738	1,000000	0,718792	0,936295	0,999999	0,701754	1,000000	0,535433	1,000000

5.3 Celkové vyhodnocení

Výsledky obsahu amygdalinu ve švestkových jádrech získané metodami HPLC/DAD a LC/MS se lišily. Metoda LC/MS ve všech případech analyzovala větší koncentrace, než HPLC/DAD (viz obrázek č.8). Největší rozdíl v koncentracích vyšel u odrůdy „Haganta“, u které se hodnoty lišily o 1,08 mg/g. Dále následovaly odrůdy „Tophit“ (o 0,91 mg/g), „Čačanská lepotica“ (o 0,67 mg/g), „Jojo“ (o 0,61 mg/g), „Toptaste“ (o 0,56 mg/g), „Promis“ (o 0,49 mg/g), „Nectavit“ (o 0,48 mg/g), „Presenta“ (o 0,46 mg/g), „Topper“ (o 0,42 mg/g), „Topenď“ (o 0,3 mg/g), „Valjevka“ (o 0,13 mg/g), „Elena“ (o 0,1 mg/g). Nejmenší rozdíl byl zjištěn u odrůdy „Tolar“, kde se jednalo o 0,06 mg/g (viz tabulka č. 11).

Tabulka 11 - Přehled průměrných koncentrací naměřených odlišnými metodami

Odrůda	koncentrace HPLC [mg/g]	koncentrace LC/MS [mg/g]	Rozdíl
Valjevka	2,20	2,33	0,13
Čačanská lepotica	1,79	2,46	0,67
Jojo	1,00	1,61	0,61
Nectavit	1,30	1,78	0,48
Promis	1,58	2,07	0,49
Tolar	1,65	1,71	0,06
Topper	1,89	2,31	0,42
Elena	2,10	2,20	0,10
Tophit	1,08	2,00	0,91
Toptaste	0,73	1,29	0,56
Presenta	1,40	1,86	0,46
Haganta	0,33	1,40	1,08
Topenď	1,50	1,80	0,30

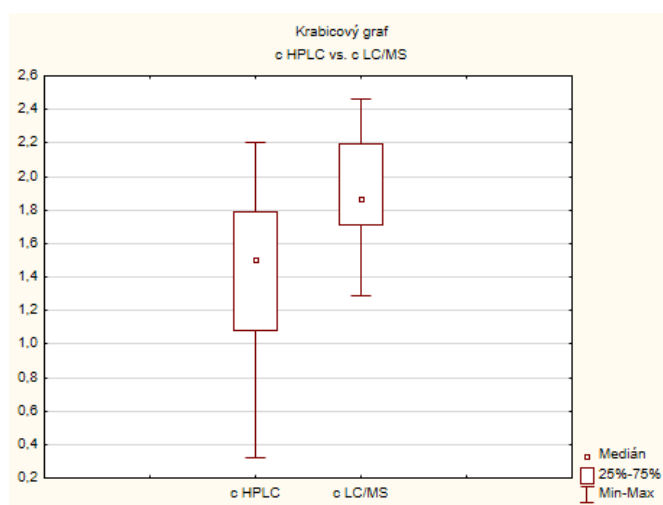


Obrázek 8 - Grafické porovnání průměrných koncentrací amygdalinu naměřených jednotlivými metodami

Tabulka 12 - Statistické porovnání metod

Proměnná	t-test pro závislé vzorky (Statistika do DP (1)) Označ. rozdíly jsou významné na hlad. $p < ,05000$							
	Průměr	Sm.odch.	N	Rozdíl	Sm.odch. rozdílu	t	sv	p
c HPLC	1,427294	0,539450						
c LC/MS	1,909605	0,361301	13	-0,482311	0,300577	-5,78553	12	0,000087

Dle tabulky č. 12 lze porovnat odlišnost metod. Průměr koncentrací naměřených LC/MS metodou je vyšší než průměr naměřený metodou HPLC. Na základě hodnoty p, která je nižší než hladina významnosti (0,05) bylo zjištěno, že jsou mezi metodami významné rozdíly. Na grafickém znázornění v obrázku č. 9 je možné vidět rozmezí koncentrací, jež je větší u metody HPLC. Metoda LC/MS má tedy méně rozptýlené hodnoty.



Obrázek 9 - Krabicový graf porovnávající obě metody

6 Diskuse

V Evropě jsou švestky pěstovány pro přímou konzumaci anebo dále zpracovávány. Nejznámějšími produkty jsou džemy, džusy, pálenky a sušené plody. V posledních letech narůstá zájem také o švestkový olej, jenž je vyráběn právě z jader švestek. Švestková jádra však obsahují kyanogenní glykosid amygdalin, který po rozkladu v organismu působí toxicky (Vladić et al. 2020). Proto je dle Górnaš et al. (2015) doporučováno před průmyslovým zpracováním švestkových jader provést stanovení množství amygdalinu. Stanovení přítomnosti amygdalinu je vhodné také po zpracování produktu.

6.1 Obsah amygdalinu v jádrech švestek

V této diplomové práci byl měřen obsah amygdalinu v jádrech třinácti odrůd švestek. Nejdříve byl amygdalin měřen metodou HPLC/DAD a poté metodou LC/MS. Výsledné koncentrace amygdalinu u jednotlivých měřených odrůd se mezi sebou významně lišily. To bylo zjištěno u obou metod. Druhá hypotéza, že se obsah amygdalinu v semenech vybraných odrůd slivoní významně liší, je tímto zjištěním potvrzena.

Po porovnání výsledků obou metod byly zjištěny rozdíly mezi koncentracemi. Ve všech třinácti analyzovaných odrůdách švestek byly metodou LC/MS naměřeny vyšší hodnoty než metodou HPLC. Nejvyšší rozdíl v koncentraci byl zaznamenán u odrůdy „Haganta“, u které se hodnoty lišily o 1,08 mg/g. Naopak nejmenší rozdíl byl u odrůdy „Tolar“, kde se výsledky různily pouze o 0,06 mg/g. Celkové rozpětí hodnot má metoda LC/MS menší oproti HPLC.

Ačkoliv byly mezi metodami menší rozdíly, metoda HPLC/DAD přinesla spolehlivé výsledky, odpovídající i měření metodou LC/MS. Metoda HPLC se osvědčila pro stanovení amygdalinu, což je ověřeno například ve studiích Bolarinwa et al. (2014) a Vladić et al. (2020). První hypotéza, že je HPLC vhodnou metodou pro stanovení amygdalinu byla potvrzena.

6.2 Porovnání koncentrací amygdalinu v jádrech švestek

Bolarinwa et al. (2014) měřili koncentraci amygdalinu v jádrech švestek zakoupených ve Velké Británii. Tyto švestky byly dovezeny z Jižní Afriky. Analýza byla provedena pomocí metody HPLC. Amygdalin byl v těchto švestkách obsažen v koncentraci 2,16 mg/g. Rozmezí koncentrací amygdalinu zjištěná v této diplomové práci jsou 0,33-2,2 mg/g (HPLC/DAD) a 1,29-2,46 mg/g (LC/MS). Uváděná hodnota ze studie spadá do obou rozmezí. Vladić et al. (2020) analyzovali metodou HPLC množství amygdalinu v jádrech švestek sklizených v Srbsku. Výsledná koncentrace byla 0,41 mg/g, což je hodnota, která se nachází v rozmezí koncentrací zjištěných metodou HPLC/DAD v této diplomové práci.

Senica et al. (2017) analyzovali obsah amygdalinu v jádrech devíti odrůd švestek, sklizených na Slovinsku, metodou hmotnostní spektrometrie. Mezi vybranými odrůdami byly tři stejné odrůdy („Čačanská lepotica“, „Jojo“ a „Valjevka“), které byly použity též pro tuto diplomovou práci. Výslednou koncentraci amygdalinu pro odrůdu „Čačanská lepotica“ autoři uvádí 2,22 mg/g. Koncentrace naměřené v této práci jsou 1,79 mg/g pro HPLC/DAD a

2,46 mg/g pro LC/MS. Nejvíce se přibližuje hladina naměřená metodou LC/MS. Další zkoumanou byla odrůda „Jojo“ s koncentrací amygdalinu 2,29 mg/g, která byla značně vyšší než zjištěné koncentrace v této práci (1 mg/g pro HPLC/DAD a 1,61 mg/g pro LC/MS). Poslední shodnou odrůdou je „Valjevka“, u níž autoři uvedli obsah amygdalinu 0,17 mg/g. Oproti obsahům naměřených v této diplomové práci se jedná o velmi nízkou hodnotu, neboť zde byly zjištěny koncentrace 2,20 mg/g (HPLC/DAD) a 2,33 mg/g (LC/MS). Rozdílné koncentrace mohou být způsobeny odlišnou metodou stanovení či jinými faktory, jako například původem vzorků, hnojením odrůd, a tak podobně.

Po porovnání s dostupnou literaturou lze potvrdit třetí hypotézu, že se skutečné obsahy amygdalinu v semenech švestek v některých případech významně liší.

7 Závěr

Zaměřením této diplomové práce byl obsah amygdalinu v jádrech švestek (*Prunus domestica*). Cílem praktické části bylo stanovení koncentrace tohoto kyanogenního glykosidu ve třinácti odrůdách švestek dvěma metodami. Metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detekcí diodovým polem (HPLC/DAD) a kapalinovou chromatografií s hmotnostním spektrometrem (LC/MS).

- U výsledných koncentrací obou metod byla provedena analýza rozptylu a poté podrobnější Scheffeho test. Na základě tohoto statistického vyhodnocení bylo možné potvrdit hypotézu, že se obsah amygdalinu v semenech vybraných odrůd slivoní významně liší.
- Průměrné koncentrace amygdalinu naměřené metodou HPLC/DAD se pohybovaly v rozmezí 0,33-2,2 mg/g sušiny. Metoda LC/MS naměřila průměrné koncentrace v rozmezí 1,29-2,46 mg/g sušiny. I přes malé rozdíly byly výsledky získané z HPLC/DAD odpovídající výsledkům z metody LC/MS. Metodu HPLC lze považovat za vhodnou pro stanovení amygdalinu. Tím se potvrzuje první hypotéza, že vhodnou HPLC metodou lze s dostatečnou spolehlivostí stanovit obsah amygdalinu v semenech švestek.
- Výsledky byly porovnány s hodnotami uváděnými v dostupné literatuře. Byla potvrzena hypotéza, že se skutečné obsahy amygdalinu v semenech švestek v některých případech významně liší v porovnání s literaturou.

8 Literatura

Abboud MM, Awaida WA, Alkhateeb HH, Abu-Ayyad AN. 2019. Antitumor action of amygdalin on human breast cancer cells by selective sensitization to oxidative stress. *Nutrition and Cancer* **71**: 483–90. DOI: 10.1080/01635581.2018.1508731

Arion CM, Tabart J, Kevers C, Niculaua M, Filimon R, Beceanu D, Dommes J. 2014. Antioxidant potential of different plum cultivars during storage. *Food Chemistry* **146**: 485–491. DOI:10.1016/j.foodchem.2013.09.072

Arshi A, Hosseini SM, Hosseini FSK, Amiri ZY, Hosseini FS, Lavasani MS, Kerdarian H, Dehkordi MS. 2019. The anti-cancer effect of amygdalin on human cancer cell lines. *Molecular Biology Reports* **46**:2059-2066.

Ayaz Z, Zainab B, Khan S, Abbasi AM, Elshikh MS, Munir A, Al-Ghamdi AA, Alajmi AH, Alsubaie QD, Mustafa AEMA. 2020. In silico authentication of amygdalin as a potent anticancer compound in the bitter kernels of family Rosaceae. *Saudi Journal of Biological Sciences* **9**: 2444-2451. DOI: 10.1016/j.sjbs.2020.06.041

Ballhorn DJ. 2011. Cyanogenic Glycosides in Nuts and Seeds. Pages 129-136 in Preedy VR, Watson RR, editors. *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention*. Elsevier Science & Technology, London.

Biehler E, Alkerwi A, Hoffmann L, Krause E, Guillaume M, Lair ML, Bohn T. 2012. Contribution of violaxanthin, neoxanthin, phytoene and phytofluene to total carotenoid intake: Assessment in Luxembourg. *Journal of Food Composition and Analysis* **1**: 56–65. DOI: 10.1016/j.jfca.2011.07.005

Blaheta RA, Nelson K, Haferkamp A, Juengel E. 2016. Amygdalin, quackery or cure? *Phytomedicine* **4**: 367–376. DOI: 10.1016/j.phymed.2016.02.004

Blažek J, Beneš V, Dlouhá J, Janečková M, Kneifl V, Kosina J, Lánský M, Paprštejn F, Pražák M, Plíšek B, Svoboda A, Staněk J, Sus J. 2001. *Ovocnictví*. Květ, Praha.

Blažek J, Pištěková I. 2009. Preliminary evaluation results of new plum cultivars

Bolarinwa IF, Orfila C, Morgan MRA. 2014. Amygdalin content of seeds, kernels and food products commercially-available in the UK. *Food Chemistry* **152**: 133-139.

Bromley J, Hughes BGM, Leong DCS, Buckley NA. 2005. Life-threatening interaction between complementary medicines: cyanide toxicity following ingestion of amygdalin and vitamin C. *The Annals of Pharmacotherapy* **39**: 1566–1569. DOI: 10.1345/aph.1E634

Butac M. 2020. Plum Breeding. IntechOpen, Available from <https://www.intechopen.com> (accessed March 2021).

Cai Y, Li YM, Zhong L. 2003. Effect of amygdalin on gastric ulcer in experimental models. *Northeast Asia Forum* **6**: 60-64.

Cox PA, Sacks OW. 2002. Cycad neurotoxins, consumption of flying foxes, and ALS-PDC disease in Guam. *Neurology* **58**: 956–959. DOI: 10.1212/wnl.58.6.956

Český statistický úřad. 2021. Ovocné stromy a keře, sklizeň ovoce, produkční plocha. Český statistický úřad, Praha. Available from <https://vdb.czso.cz> (accessed March 2021).

Davignon JP, Trissel LA, Kleinman LM. 1978. Pharmaceutical assessment of amygdalin (Laetrile) products. *Cancer Treatment Reports* **1**: 99-104.

Deng JG, Wang HL, Liu YD, Li CY, Hao EW, Du ZC, Bao CH, Lv JZ, Wang Y. 2012. Anti-atherosclerotic effects mediated by the combination of probucol and amygdalin in apolipoprotein e-knockout mice fed with a high fat diet. *Journal of Animal and Veterinary Advances* **1**: 20-25.

Dicenta F, Martínez-Gómez P, Grané N, Martín ML, León A, Cánovas JA, Berenguer V. 2002. Relationship between cyanogenic compounds in kernels, leaves, and roots of sweet and bitter kernelled almonds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **7**: 2149–2152. DOI: 10.1021/jf0113070

Dogru HY, Isguder CK, Arici A, Ozsoy AZ, Delibas IB, Cakmak B. 2017. Effect of amygdalin on the treatment and recurrence of endometriosis in an experimental rat study. *Periodicum Biologorum* **3**: 173-180. DOI: 10.18054/pb.v119i3.4767

Dorr RT, Paxinos J. 1978. The current status of laetrile. *AnnIntern Med* **89**: 389–397. DOI: 10.7326/0003-4819-89-3-389

El-Desouky MA, Fahmi AA, Abdelkader IY, Nasraldin KM. 2020. Anticancer effect of amygdalin (vitamin b-17) on hepatocellular carcinoma cell line (HepG2) in the presence and absence of zinc. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **4**: 486–494. DOI: 10.2174 / 1871520620666200120095525

Elsaed WM. 2019. Amygdalin (Vitamin B17) pretreatment attenuates experimentally induced acute autoimmune hepatitis through reduction of CD4+cell infiltration. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger* **224**: 124-132. DOI: 10.1016/j.aanat.2019.04.006

FAO. 2020. FAOSTAT: Crops. FAO, Rome. Available from <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> (accessed March 2021).

Ghiulai VM, Socaciu C, Jianu I, Ranga F, Fetea F. 2006. Identification and quantitative evaluation of amygdalin from apricot, plum and peach oils and kernels. *Buletin USAMV-CN* **62**: 246–253.

Górnaš P, Mišina I, Grāvīte I, Lačis G, Radenkovs V, Olšteine A, Seglina D, Kaufmane E, Rubauskis E. 2015. Composition of tocopherols in the kernels recovered from plum pits: the impact of the varieties and species on the potential utility value for industrial application. *European Food Research Technology* **241**: 513–520. DOI: 10.1007/s00217-015-2480-4

Guo JQ, Wu WZ, Sheng MX, Yang SL, Tan JM. 2013. Amygdalin inhibits renal fibrosis in chronic kidney disease. *Molecular Medicine Reports* **5**:1453-1457.

Hall CA, Tokusoglu O. 2011. *Fruit and cereal bioactives: sources, chemistry, and applications*. Taylor & Francis Group, Baton Rouge.

Hartmann W, Neumüller M. 2008. Plum breeding. Pages 161–231 in Jain SM, Priyadarshan, editors. *Breeding plantation tree crops: temperate species*. Springer Science + Business Media, Berlin.

He XY, Wu LJ, Wang WX, Xie PJ, Chen YH, Wang F. 2020. Amygdalin – A pharmacological and toxicological review. *Journal of Ethnopharmacology* **254**: 112717. DOI: 10.1016/j.jep.2020.112717.

Helena M, Medvedova M, Maruniakova N, Kolesarova A. 2015. Assessment of a potential preventive ability of amygdalin in mycotoxin-induced ovarian toxicity. *Journal of Environmental Science and Health–Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* **6**: 411-416.

Humbert JR, Tress JH, Braico KT. 1977. Fatal cyanide poisoning from accidental ingestion of amygdalin. *JAMA* **6**: 482. DOI: 10,1001 / jama.238.6.482c

Hwang HJ, Kim P, Kim CJ, Lee HJ, Shim I, Yin CS, Yang Y, Hahm DH. 2008. Antinociceptive effect of amygdalin isolated from *Prunus armeniaca* on formalin-induced pain in rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **8**: 1559-1564. **A**

Hwang HJ, Lee HJ, Kim CJ, Shim I, Hahm DH. 2008. Inhibitory Effect of Amygdalin on Lipopolysaccharide-inducible TNF-alpha and IL-1 beta mRNA Expression and Carrageenan-Induced Rat Arthritis. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **10**: 1641-1647. **B**

Chan TY. 2006. A probable case of amygdalin-induced peripheral neuropathy in a vegetarian with vitamin B12 deficiency. *Therapeutic Drug Monitoring* **28**: 140-141. DOI: 10.1097/01.ftd.0000179419.40584.15

Chang HK, Shin MS, Yang HY, Lee JW, Kim YS, Lee MH, Kim J, Kim KH, Kim CJ. 2006. Amygdalin induces apoptosis through regulation of Bax and Bcl-2 expressions in human DU145 and LNCaP prostate cancer cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **29**: 1597-1602.

Chang HK, Yang HY, Lee TH, Shin MCh, Lee MH, Shin MS, Kim OJ, Hong SP, Cho S. 2005. Armeniaca semen extract suppresses lipopolysaccharide-induced expressions of cyclooxygenase [correction of cycloosygenase]-2 and inducible nitric oxide synthase in mouse BV2 microglial cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **28**: 449-454. DOI: 10.1248/bpb.28.449

Chaouali N, Gana I, Dorra A, Khelifi F, Nouioui A, Masri W, Belwaer I, Ghorbel H, Hedhili A. 2013. Potential toxic levels of cyanide in almonds (*Prunus amygdalus*), apricot kernels (*Prunus armeniaca*) and amond syrup. *ISRN Toxicology* **2013**: 610648. DOI: 10.1155 / 2013/610648

Chen Y, Al-Ghamdi AA, Elshikh MS, Shah MH, Al-Dosary MA, Abbasi AM. 2020. Phytochemical profiling, antioxidant and HepG2 cancer cells' antiproliferation potential in the kernels of apricot cultivars. *Saudi Journal of Biological Sciences* **27**: 163-172.

Chen Y, Ma J, Wang F, Hu J, Cui A, Wei Ch, Yang Q, Li V. 2012. Amygdalin induces apoptosis in human cervical cancer cell line HeLa cells. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* **1**: 43-51.

Cheng Y, Yang Ch, Zhao J, Tse HF, Rong J. 2015. Proteomic identification of calcium-binding chaperone calreticulin as a potential mediator for the neuroprotective and neurotogenic activities of fruit-derived glycoside amygdalin. *Journal of Nutritional Biochemistry* **26**: 146-154.

Igwe EO, Charlton KE. 2016. A Systematic Review on the Health Effects of Plums (*Prunus domestica* and *Prunus salicina*). *Phytotherapy Research* **30**: 701-731. DOI:10.1002/ptr.5581

in a dense planting. *Horticultural Science* **36**: 45-54. DOI: 10.17221/3/2009-HORTSCI
Jan T. 2020 Švestka, pološvestka, slíva a jiné: odrůdy slivoní vhodné do zahrady. *Zahradkář*, Available from <https://izahradkar.cz/> (accessed March 2021).

Janakiev T, Dimkic I, Bojic S, Fira D, Stankovic S, Beric T. 2020. Bacterial communities of plum phyllosphere and characterization of indigenous antagonistic *Bacillus thuringiensis* R3/3 isolate. *Journal of Applied Microbiology* **128**: 528-543. DOI:10.1111/jam.14488

Jaswal V, Palanivelu J, Ramalingam C. 2018. Effects of the Gut microbiota on Amygdalin and its use as an anti-cancer therapy: Substantial review on the key components involved in altering dose efficacy and toxicity. *Biochemistry and Biophysics Reports* **14**:125-136. DOI: 10.1016/j.bbrep.2018.04.008

Juengel E, Thomas A, Rutz J, Makarevic J, Tsaor I, Nelson K, Haferkamp A, Blaheta RA. 2016. Amygdalin inhibits the growth of renal cell carcinoma cells in vitro. *International Journal of Molecular Medicine* **37**: 526-532. DOI: 10.3892/ijmm.2015.2439

Kutina J, Barborka A, Cvopa J, Cvopová E, Fiala Š, Kalášek J, Kraus V, Pospíšilová D, Richter M, Sodoma V, Svoboda V, Šenk L, Vachůn Z, Vondráček J, Záruba P, Zlatošová B. 1991. *Pomologický atlas 1. Zemědělské nakladatelství Brázda, Praha.*

Lara MV, Bonghi C, Famiani F, Vizzotto G, Walker RP, Drincovich MF. 2020. Stone fruit as biofactories of phytochemicals with potential roles in human nutrition and health. *Frontiers in Plant Science* **11**: 562252. DOI:10.3389/fpls.2020.562252

Lee HM, Moon A. 2016. Amygdalin regulates apoptosis and adhesion in Hs578T triple-negative breast cancer cells. *Biomolecular and Therapeutics* **1**:62-66.

Lee SH, Oh A, Shin SH, Kim HN, Kang WW, Chung SK. 2017. Amygdalin Contents in Peaches at Different Fruit Development Stages. *Preventive Nutrition and Food Science* **22**: 237-240. DOI: 10.3746/pnf.2017.22.3.237

Lee SH, Soyoola E, Chanmugam P, Hart S, Sun W, Zhong H, Liou S, Simmons D, Hwang D. 1992. Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *The Journal of Biological Chemistry* **267**: 25934-25938.

Lerner IJ. 1981. Laetrile: a lesson in cancer quackery. *CA: A cancer journal for clinicians* **31**: 91-95. DOI: 10.3322/canjclin.31.2.91

Liaudanskas M, Okuleviciute R, Lanauskas J, Kviklys D, Zymone K, Rendyuk T, Zvikas V, Uselis N, Janulis V. 2020. Variability in the Content of Phenolic Compounds in Plum Fruit. *Plants* **9**: 1611. DOI:10.3390/plants9111611

Lilienthal N. 2014. Amygdalin – fehlende Wirksamkeit und schädliche Nebenwirkungen. *Bulletin zur Arzneimittelsicherheit* **3**: 7-13.

Litz RE. 2004. *Biotechnology of fruit and nut crops. Biotechnology in agriculture series. CABI, Wallingford.*

Luo DM, Shan ZG, Ge JL, Liu Q, Luo L. 2015. Effects of amygdalin on TNF- α and sICAM-1 of rats with type II collagen-induced arthritis. *Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine* **7**: 75-77. DOI: 10.3969/j.issn.1005-5304.2015.07.021

- Luo H, Li J, Tang J, Zhang F, Zhao F, Sun D, Zheng F, Wang X. 2016. Amygdalin inhibits HSC-T6 cell proliferation and fibrosis through the regulation of TGF- β /CTGF. *Molecular & Cellular Toxicology* **12**: 265-271.
- Luo H, Zhao F, Zhang F, Liu N. 2018. Influence of amygdalin on PDG, IGF and PDGFR expression in HSC-T6 cells. *Experimental and Therapeutic Medicine* **4**: 3693-3698.
- Lv J, Xiong W, Lei T, Wang H, Sun M, Hao E, Wang Z, Huang X, Deng S, Deng J, Wang Y. 2017. Amygdalin ameliorates the progression of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Molecular Medicine Reports* **6**: 8171-8179. DOI:10.3892/mmr.2017.7609
- Makarević J, Tsaour I, Juengel Eva, Borgmann H, Nelson K, Thomas Ch, Bartsch G, Haferkamp A, Blaheta RA. 2016. Amygdalin delays cell cycle progression and blocks growth of prostate cancer cells in vitro. *Life Sciences* **147**: 137-142.
- Martini N. 2018. Potion or Poison? Amygdalin. *Journal of Primary Health Care* **4**: 354-355. DOI:10.1071/hc15939
- Maxwell DM. 1978. Increased cyanide values in a laetrile user. *Canadian Medical Association Journal* **119**:18.
- Merino P. 2019. *Chemical biology of neurodegeneration: A molecular approach*. John Wiley & Sons, Inc., Weinheim.
- Milazzo S, Horneber M, Ernst E. 2015. Laetrile treatment for cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews* **4**: CD005476. DOI: 10.1002/14651858.CD005476.pub4
- Milazzo S, Lejeune S, Ernst E. 2007. Laetrile for cancer: a systematic review of the clinical evidence. *Supportive Care in Cancer* **15**: 583-595. DOI: 10.1007 / s00520-006-0168-9
- Moradipoodeh B, Jamalan M, Zeinali M, Fereidoonnehzad M, Mohammadzadej G. 2020. Specific targeting of HER2-positive human breast carcinoma SK-BR-3 cells by amygdaline-ZHER2 affibody conjugate. *Molecular Biology Reports* **47**: 7139-7151.
- Morse DL, Boros L, Findley PA. 1979. More on cyanide poisoning from Laetrile. *New England Journal of Medicine* **301**: 892.
- Mosayyebi B, Imani M, Mohammadi L, Akbarzadeh F, Zarghami N, Edalati M, Alizadeh E, Rahmati M. 2020. An update on the toxicity of cyanogenic glycosides bioactive compounds: Possible clinical application in targeted cancer therapy. *Materials Chemistry and Physics* **246**: 122841. DOI: 10.1016/j.matchemphys.2020.122841

Moslehi A, Farahabadi M, Chavoshzadeh SA, Barati A, Ababzadeh S, Mohammadbeigi A. 2018. The effect of amygdalin on endoplasmic reticulum (ER) stress induced hepatic steatosis in mice. *Malaysian Journal of Medical Sciences* **1**: 16-23.

Oberbeil K, Lenzová Ch. 2001. *Ovoce a zelenina jako lék*. Fortuna Print, Praha.

Ortega JA, Creek JE. 1978. Acute cyanide poisoning following administration of laetrile enemas. *The Journal of Pediatrics* **93**: 1059. DOI: 10.1016 / s0022-3476 (78) 81261-x

Oyewole OI, Olayinka ET. 2009. Hydroxocobalamin (vit B12a) effectively reduced extent of cyanide poisoning arising from oral amygdalin ingestion in rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences* **1**: 8-11.

Park HJ, Yoon SH, Han LS, Zheng LT, Jung KH, Uhm YK, Lee JH, Jeong JS, Joo WS, Yim SV, Chung JH, Hong SP. 2005. Amygdalin inhibits genes related to cell cycle in SNU-C4 human colon cancer cells. *World Journal of Gastroenterology* **11**: 5156–5161. DOI: 10.3748/wjg.v11.i33.5156

Press B, Emberson C. 2016. *Green guide to trees of Britain and Europe*. Bloomsbury Publishing Plc, London.

Qian L, Xie B, Wang Y, Qian J. 2015. Amygdalin-mediated inhibition of non-small cell lung cancer cell invasion in vitro. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* **8**: 5363-5370.

Rieger M. 2006. *Introduction to Fruit Crops*. The Haworth Press, New York.

Roussos PA, Efstathios N, Intidhar B, Denaxa NK, Tsafouros A. 2016. Plum (*Prunus domestica* L. and *P. salicina* Lindl.). Pages 639-666 in Simmonds MSJ, Preedy VR, editors. *Nutritional composition of fruit cultivars*. Elsevier Science & Technology, London.

Sauer H, Wollny C, Oster I, Tutdibi E, Gortner L, Gottschling S, Meyer S. 2015. Severe cyanide poisoning from an alternative medicine treatment with amygdalin and apricot kernels in a 4-year-old child. *Wien Med. Wochenschr* **165**: 185–188. DOI: 10.1007 / s10354-014-0340-7

Shim SM, Kwon H. 2010. Metabolites of amygdalin under simulated human digestive fluids. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **8**: 770–779. DOI:10.3109/09637481003796314

Shively RM, Harding SA, Hoffman RS, Hill AD, Astua AJ, Manini AF. 2020. Rebound metabolic acidosis following intentional amygdalin supplement overdose. *Clinical Toxicology* **58**: 290-293.

Schmidt K, Ernst E. 2004. Assessing websites on complementary and alternative medicine for cancer. *Annals of Oncology* **15**:733-742. DOI: 10.1093/annonc/mdh174

Song Z, Xu X. 2014. Advanced research on anti-tumor effects of amygdalin. *J Can Res Ther* **10**: 3–7. DOI:10.4103/0973-1482.139743

Speijers G. 2015. Cyanogenic glycosides. National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven. Available from <http://www.inchem.org> (accessed March 2021).

Stacewicz-Sapuntzakis M, Bowen PE, Hussain EA, Damayanti-Wood BI, Farnsworth NR. 2001. Chemical composition and potential health effects of prunes: a functional food? *Critical Reviews Food Science and Nutrition* **41**: 251-86. DOI: 10.1080/20014091091814

Strugala GJ, Stahl R, Elsenhans B, Rauws AG, Forth W. 1995. Small-intestinal transfer mechanism of prunasin, the primary metabolite of the cyanogenic glycoside amygdalin. *Human & Experimental Toxicology* **11**: 895–901. DOI: 10.1177/096032719501401107

Sylvester DM, Sander C. 1990. Immunohistochemical localization of rhodanese. *The Histochemical Journal* **22**: 197–200.

Tanyildizi S, Bozkurt T. 2002. In vitro effects of linamarin, amygdalin and gossypol acetic acid on hyaluronidase activity, Sperm motility and morphological abnormality in bull sperm. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* **28**: 819-824.

Todorova A, Pesheva M, Iliev I, Bardarov K, Todorova T. 2017. Antimutagenic, antirecombinogenic, and antitumor effect of amygdalin in a yeast cell-based test and mammalian cell lines. *Journal Of Medicinal Food* **0**: 1-7. DOI: 10.1089/jmf.2016.0108

Třísková A, Rudá Kučerová J. 2019. Can amygdalin provide any benefit in integrative anticancer treatment?. *Klinicka Onkologie* **32**: 360-366. DOI:10.14735/amko2019360

USDA. 2020. FoodData Central Search Results. USDA, Washington DC. Available from <https://fdc.nal.usda.gov/index.html> (accessed March 2021).

Vladić J, Gavarić A, Jokić S, Pavlović N, Moslavac T, Popović L, Matias A, Agostinho A, Banožić M, Vidović S. 2020. *Acta Chimica Slovenica* **67**: 778–784. DOI: 10.17344/acsi.2019.5690

Vysloužil J. 2015. Databáze odrůd ovocných dřevin. Jiří Vysloužil, Available from http://jirivyslouzil.cz/databaze_ovoce/ (accessed March 2021).

Wagner B, Galey WR. 2003. Kinetic analysis of hexose transport to determine the mechanism of amygdalin and prunasin absorption in the intestine. *Journal of Applied Toxicology* **5**: 371–375. DOI:10.1002/jat.934

Wang R, Zhang D, Sun K, Peng J, Zhu W, Yin S, Tang D, Wu Y. 2021. Amygdalin promotes the activity of T cells to suppress the progression of HBV-related hepatocellular carcinoma via the JAK2/STAT3 signaling pathway. *BMC Infectious Diseases* **21**: 56. DOI: 10.1186/s12879-020-05713-0

Williams A. 2018. *Cancer* SB, 8th. Omnigraphics, Detroit.

Yang HY, Chang HK, Lee JW, Kim YS, Kim H, Lee MH, Shin MS, Ham DH, Park HK, Lee H, Kim ChJ. 2007. Amygdalin suppresses lipopolysaccharide-induced expressions of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in mouse BV2 microglial cells. *Neurological Research* **29**: 59-64.

Yang Ch, Zhao J, Cheng Y, Li X, Rong J. 2014. Amygdalin as a potent neurotrophic agent from herbal medicine semen persicae extract. *BioMed Research International*. Available from <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/306857/> (accessed October 2020). DOI: 10.1155 / 2014/306857

Yildirim FA, Askin MA. 2010. Variability of amygdalin content in seeds of sweet and bitter apricot cultivars in Turkey. *African Journal of Biotechnology* **9**: 6522–6524.

Ying J, Ge QW, Hu SF, Luo C, Lu FY, Yu YK, Xu TT, Lv SJ, Zhang L, Shen J, Chen D, Tong PJ, Xiao LW, Li J, Jin HT, Wang P. 2020. Amygdalin promotes fracture healing through TGF-beta/Smad signaling in mesenchymal stem cells. *Stem Cells International*. Available from <https://www.hindawi.com/journals/sci/2020/8811963/> (accessed October 2020). DOI: 10.1155/2020/8811963

Zeng XL, Lv HB, Huang XW. 2020. Amygdalin protects apoptosis of retinal ganglionic cells in glaucoma rats by regulating the expressions of anti-and pro-apoptotic proteins. *TROPICAL Journal of Pharmaceutical Research* **6**: 1179-1184. DOI: 10.4314/tjpr.v19i6.9

Zhang X, Hu J, Zhuo Y, Cui L, Li C, Cui N, Zhang S. 2018. Amygdalin improves microcirculatory disturbance and attenuates pancreatic fibrosis by regulating the expression of endothelin-1 and calcitonin gene-related peptide in rats. *Journal of the Chinese Medical Association* **81**: 437-443.

Zhao F, Yang Z. 2012. Amygdalin attenuates atherosclerosis progress through inhibiting toll-like receptors expression and activity. *Journal of Animal and Veterinary Advances* **10**: 1613-1621.

- Zhao Y. 2012. Amygdalin content in four stone fruit species at different developmental stages. *ScienceAsia* **38**: 218–222. DOI: 10.2306/scienceasia1513-1874.2012.38.218
- Zheng QL, Guo YC, Sun J, Xie GQ, Li XN, Liao GL. 2009. An experiment of amygdalin induced premature chromosome condensation in human blood T-lymphocytes. *Journal of Environmental & Occupational Medicine* **6**: 572-574.
- Zhou CS, Qian LC, Ma HL, Yu XJ, Zhang YZ, Qu WJ, Zhang XX, Xia W. 2012. Enhancement of amygdalin activated with beta-D-glucosidase on HepG2 cells proliferation and apoptosis. *Carbohydrate Polymers* **90**: 516-523.
- Zhou J, Hou J, Rao J, Zhou CH, Liu YL, Gao WX. 2020. Magnetically directed enzyme/prodrug prostate cancer therapy based on p-glucosidase/amygdalin. *International Journal of Nanomedicine* **15**: 4639-4657, DOI: 10.2147/IJN.S242359
- Zohary D, Hopf M, Weiss E. 2012. Domestication of plants in the Old World – The origin and spread of domesticated plants in South-west Asia, Europe, and the Mediterranean Basin. Oxford University Press, Oxford.

9 Seznam obrázků

Obrázek 1 - Struktura amygdalinu (Lee & Moon 2016)	12
Obrázek 2 - Přehled sklizní švestek v ČR v jednotlivých letech (upraveno podle Českého statistického úřadu 2021)	24
Obrázek 3 - Přehled variability pecek u jednotlivých odrůd	29
Obrázek 4 - Přehled variability jader jednotlivých odrůd.....	29
Obrázek 5 - Kalibrační křivka amygdalinu.....	33
Obrázek 6- Grafické znázornění průměrné koncentrace amygdalinu v závislosti na odrůdě (HPLC).....	36
Obrázek 7 - Grafické znázornění průměrné koncentrace amygdalinu v závislosti na odrůdě (LC/MS).....	38
Obrázek 8 - Grafické porovnání průměrných koncentrací amygdalinu naměřených jednotlivými metodami	39
Obrázek 9 - Krabicový graf porovnávající obě metody	40

10 Seznam tabulek

Tabulka 1- Naměřené hodnoty amygdalinu v ovocných jádrech (Bolarinwa et al. 2014)	13
Tabulka 2 - Přehled datumů sklizní odrůd.....	30
Tabulka 3 - Průměrné koncentrace a směrodatné odchylky amygdaliny u metody HPLC/DAD	35
Tabulka 4 - Popisné statistiky amygdalinu všech odrůd (metoda HPLC).....	36
Tabulka 5 - Analýza rozptylu pro HPLC/DAD metodu	36
Tabulka 6 - Scheffeho test pro HPLC/DAD metodu	37
Tabulka 7 - Průměrné koncentrace a směrodatné odchylky amygdaliny u metody LC/MS	37
Tabulka 8- Popisné statistiky amygdalinu všech odrůd (metoda LC/MS)	38
Tabulka 9 - Analýza rozptylu pro LC/MS metodu	38
Tabulka 10 - Sheffeho test pro LC/MS metodu.....	38
Tabulka 11 - Přehled průměrných koncentrací naměřených odlišnými metodami	39
Tabulka 12 - Statistické porovnání metod	40