

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Pedagogická fakulta

Katedra aplikované chemie

Bakalářská práce

**Biologicky aktivní látky v netradiční listové
zelenině**

2020

Markéta Friedbergerová

Prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci s názvem Biologicky aktivní látky v netradiční listové zelenině jsem zpracovala samostatně pouze s použitím pramenů citovaných v seznamu použité literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě Pedagogickou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledky obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

Datum:

Podpis studenta:

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí bakalářské práce paní doc. Ing. Evě Dadákové, Ph.D. za trpělivost, odborné vedení a cenné připomínky a rady v průběhu zpracování této práce. Také bych chtěla poděkovat paní Ing. Tamaře Pelikánové za pomoc s přípravou a zpracováním vzorků k následné analýze.

Abstrakt

Flavonoidy se v současné době stále více dostávají do popředí zájmu nejen vědecké obce, ale také veřejnosti. Byly shledány jako velice přínosné v oblasti prevence vzniku kardiovaskulárních, případně nádorových onemocnění. Dále u nich byly prokázány antioxidační, antialergické nebo protizánětlivé účinky.

V této bakalářské práci byly zkoumány obsahy látek, konkrétně kvercetin, kemferolu, morinu, myricetin, apigenin a luteolin, pomocí metody HPLC. K analýze byl vybrán lyofilizovaný materiál čtyř odrůd asijské listové zeleniny čeledi brukvovitých: *Namenia*, *Sagami*, *Golden Lion* a *Tatsoi*. Všechny vzorky byly pěstovány v jarním a podzimním osevu. Byly stanoveny pouze dva ze sledovaných aglykonů, a to kvercetin a kemferol.

Nejvyšší obsah celkového kvercetin byl zaznamenán v podzimním osevu *Namenie* 1360 mg/kg sušiny, obsah celkového kemferolu 1300 mg/kg sušiny v odrůdě *Golden Lion*, rovněž při podzimním osevu. Při přepočtu na čerstvou hmotu byly nejvyšší koncentrace obou aglykonů naměřeny u *Namenie* při podzimním osevu. Množství kvercetin bylo stanoveno 157 mg/kg čerstvé hmoty, zatímco obsah kemferolu 114 mg/kg čerstvé hmoty.

Klíčová slova: brukvovité, listová zelenina, flavonoidy, kvercetin, kemferol, HPLC

Abstract

Flavonoids are now increasingly coming to the forefront of interest not only from the scientific community but also of the public. They were found to be very beneficial in the field of prevention of cardiovascular or cancer diseases. In addition, they have proven to have antioxidant, anti-allergic or anti-inflammatory effects.

In this bachelor 's thesis, the contents of substances, namely quercetin, kaempferol, morin, myricetin, apigenin and luteolin, were investigated using HPLC method. Lyophilized material of four varieties of Asian leafy vegetable from the cruciferous family was selected for analysis: Namenia, Sagami, Golden Lion and Tatsoi. All samples were grown in spring and autumn sowing period. Only two of the monitored aglycones, quercetin and kaempferol, were determined.

The highest content of total quercetin was registered in the autumn sowing period of Namenia 1360 mg/kg of dry matter, the content of total kaempferol 1300 mg/kg of dry matter in the Golden Lion variety, also in autumn sowing period. After conversion to fresh mass, the highest concentrations of both aglycones were measured in Namenia during autumn sowing period. The amount of quercetin was determined to be 157 mg/kg of fresh weight, while the kaempferol content was 114 mg/kg of fresh weight.

Key words: Brassicaceae, leafy vegetable, flavonoids, quercetin, kaempferol, HPLC

| | |
|---|-----------|
| I. ÚVOD | 8 |
| II. LITERÁRNÍ PŘEHLED | 9 |
| 1. Listová zelenina | 9 |
| 1.1. Brukev řepák (<i>Brassica rapa</i>) | 10 |
| 1.1.1. Namenia (<i>Brassica rapa</i> var. <i>rapa</i>) | 10 |
| 1.1.2. Pak Choi/Brukev čínská (<i>Brassica rapa</i> ssp. <i>chinensis</i>) | 11 |
| 1.1.3. Tatsoi (<i>Brassica rapa</i> ssp. <i>rosularis</i>) | 12 |
| 1.2. Podmínky pěstování brukvovité zeleniny | 13 |
| 2. Rostlinné polyfenolické látky | 14 |
| 2.1. Flavonoidy | 14 |
| 2.1.1. Flavony | 15 |
| 2.1.1.1. Apigenin | 16 |
| 2.1.1.2. Luteolin | 16 |
| 2.1.2. Flavanony | 17 |
| 2.1.3. Flavonoly | 17 |
| 2.1.3.1. Kemferol | 18 |
| 2.1.3.2. Kvercetin | 18 |
| 2.1.3.3. Myricetin | 19 |
| 2.1.3.4. Rutin | 19 |
| 2.1.4. Flavanoly | 20 |
| 2.1.4.1. Katechiny | 20 |
| 2.1.4.2. Proanthokyanidiny | 21 |
| 2.1.5. Anthokyany a anthokyanidiny | 22 |
| 2.1.6. Leukoanthokyanidiny | 23 |
| 2.1.7. Chalkony a dihydrochalkony, aurony | 24 |
| 2.1.8. Isoflavonoidy a neoflavonoidy | 24 |
| 2.2. Tanniny | 25 |
| 2.2.1. Hydrolyzovatelné tanniny | 25 |
| 2.2.2. Kondenzované tanniny | 26 |
| 2.3. Lignany | 26 |
| 3. Analytická separační metoda - HPLC | 27 |
| 3.1. Základní pojmy | 27 |
| 3.2. Stacionární fáze HPLC | 28 |
| 3.3. Mobilní fáze HPLC | 28 |
| 3.4. Instrumentace v kapalinové chromatografii | 29 |
| 3.4.1. Čerpadlo | 29 |
| 3.4.1.1. Dávkování | 29 |
| 3.4.2. Kolona | 30 |
| 3.4.3. Detektor | 30 |
| III. CÍLE PRÁCE | 32 |

| | |
|---|-----------|
| IV. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 33 |
| 1. Použité chemikálie a přístroje | 33 |
| 1.1. Chemikálie | 33 |
| 1.2. Laboratorní sklo a přístroje | 33 |
| 2. Příprava rostlinného materiálu | 34 |
| 3. Metodika zpracování vzorků | 34 |
| 4. Stanovení flavonoidních aglykonů | 35 |
| 5. Použité statistické metody | 36 |
| V. VÝSLEDKY A DISKUSE | 37 |
| 1. Namenia (<i>Brassica rapa</i> var. <i>rapa</i>) | 38 |
| 2. Pak Choi/Brukev čínská (<i>Brassica rapa</i> ssp. <i>chinensis</i>) – odrůda Sagami | 40 |
| 3. Pak Choi/Brukev čínská (<i>Brassica rapa</i> ssp. <i>chinensis</i>) – odrůda Golden Lion | 42 |
| 4. Tatsoi (<i>Brassica rapa</i> ssp. <i>rosularis</i>) | 44 |
| VI. ZÁVĚR | 46 |
| VII. POUŽITÁ LITERATURA | 47 |

I. Úvod

Listová zelenina je specifickou skupinou rostlin náležící do různých botanických čeledí, jejichž společným pojítkem je využití v syrové podobě do nejrůznějších salátů. Vzhledem k jejímu nízkému energetickému obsahu je oblíbeným doplňkem každodenní stravy. Některé obsahové látky, zejména rostlinné polyfenoly, mají intenzivní antioxidační účinky a mohou přispět k prevenci civilizačních onemocnění, jako jsou kardiovaskulární onemocnění nebo rakovina. Tradiční sortiment listové zeleniny se v poslední době rozšiřuje a na trh se i k drobným pěstitelům dostávají druhy rostlin, které nejsou v našich podmínkách příliš známé. Mnoho neobvyklých druhů této zeleniny pochází především z asijských lokalit, kde jsou využívány v místní gastronomii.

Cílem této bakalářské práce bude zjistit obsah vybraných fenolických látek, zejména flavonoidů a fenolických kyselin ve vybraných méně známých druzích listové zeleniny vypěstované v místních podmínkách.

II. Literární přehled

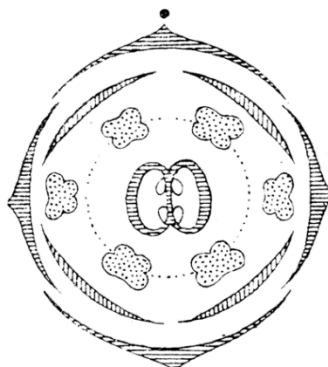
1. Listová zelenina

Listová zelenina je zelenina, jejíž konzumní části jsou listy nebo stopky. V této práci jsem se zabývala především zeleninou z čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*). Jedná se o poměrně velkou skupinu dvouděložných rostlin, z nichž je většina zástupců řazena mezi byliny. Jsou rozšířené po celém světě, především v mírném pásu, hojně se nacházejí v květeně České republiky. Celkově zahrnují přes čtyři tisíce druhů ve 372 rodech. Mezi nejznámější zástupce patří například peníze rolní, kokoška pastuší tobolka, huseníček rolní, hořčice polní nebo česnáček lékařský. Do této čeledi mimo jiné náleží také významné zemědělské plodiny jako kapusta, růžičková kapusta, květák, brokolice, zelí, pekingské zelí, křen, ředkev nebo řepka (VALÍČEK P. *et al*, 2002).

Bývají také pěstovány jako okrasné rostliny či skalničky a svůj význam si našly také v přírodní medicíně. Mezi charakteristické obsahové látky náleží zejména sirné glykosidy zvané glykosinoláty, které způsobují štiplavou chuť brukvovitých rostlin (ANJUM N. A. *et al*, 2012).

Rostliny z čeledi brukvovitých jsou převážně jednoleté, dvouleté, nebo vytrvalé byliny s čtyřčetnými, většinou oboupohlavnými a pravidelnými květy, nejčastěji žlutého, bílého či purpurového zbarvení, tvořící hroznovitá květenství – hrozen, chocholík, lata. Kalich i koruna jsou složeny ze čtyř volných lístků, v květu lze nalézt 6 čtyřmocných tyčinek uspořádaných ve dvou kruzích, jež jsou typickým znakem této čeledi, dále semeník, srostlý ze dvou plodolistů, který může být svrchní, přisedlý, či stopkatý a nektarové žlázy, zvané medníky, jejichž stavba, počet a uložení přispívá k rozlišovacím znakům brukvovitých. U mnoha zástupců je vyvinuta přízemní růžice listů. Mají jednoduché, střídavě uspořádané listy s celistvou až silně členěnou čepelí a charakteristické plody, zvané šešule (AL-SHEHBAZ I. A., 2012). V jejich základních pletivech se nachází tvarově odlišné buňky, zvané idioblasty, které obsahují enzym myrosinase (jinak také myrosinové buňky), jež ve vodném prostředí štěpí glykosidy sousedních buněk. Při této reakci vznikají kromě glukosy a síranu draselného v kyselé formě také hořčičné silice, charakteristické svým štiplavým zápachem a ostrou chutí (SMITH N. *et al*, 2004).

Listová zelenina zahrnující salát, zelí, špenát, kapustu, brokolici nebo hořčičnou zeleninu se vyznačuje nízkým obsahem kalorií, vysokým obsahem vlákniny, minerálů, dále v nich můžeme najít bílkoviny a vitamíny (SEONG G.-U. *et al.*, 2016).



Obrázek 1. Květní diagram rodu *Brassica* (zdroj: wikipedia.org)

Květní vzorec rodu *Brassica*: ♂ K₂₊₂ C₄ A₂₊₄ G₍₂₎

1.1. Brukev řepák (*Brassica rapa*)

Brukev řepák je rostlina patřící do čeledi brukvovitých. Skládá se z rozmanitých, široce pěstovaných druhů zahrnujících vodnici (*Brassica rapa rapifera*), pekingské zelí (*Brassica rapa ssp. pekinensis*), čínské zelí (*Brassica rapa ssp. chinensis*), namenii (*Brassica rapa var. rapa*), tatsoi (*Brassica rapa ssp. rosularis*) a olejnodárnou rostlinu brukev řepák olejný (*Brassica rapa oleifera*), jejichž charakteristika a vlastnosti budou vypsány v následujících podkapitolách. Využívá se jednak jako konzumní zelenina, jednak i jako krmivo pro dobytek, a to převážně vodnice. Jedná se o nenáročnou rostlinu, kterou lze bez obtíží pěstovat i v chladnějších oblastech (STACE C. A., 1997).

1.1.1. Namenia (*Brassica rapa var. rapa*)

Namenia je velmi chutná a robustní listová zelenina pocházející z Číny a Japonska. Má dlouhou vegetační dobu a velmi dobře snáší chlad. Je velice podobná mizuně, avšak nemá tolik oddělené listy. Pro svou různorodost barev a textur je ideální pro přípravu míchaných salátů. Její listy mají středně až světle zelenou barvu a jemně pikantní chuť (TAMAR ORGANICS, 2018).



Obrázek 2. *Namenia* (zdroj: doc. Ing. Eva Dadáková, Ph.D., katedra aplikované chemie, 2018)

1.1.2. Pak Choi/Brukev čínská (*Brassica rapa ssp. chinensis*)

Pak Choi, mimo jiné známá také pod názvem Bok Choy nebo čínský mangold, je rychle rostoucí jednoletá asijská zelenina s charakteristickými vlastnostmi, jež ji vyčleňují od mnoha ostatních druhů orientální listové zeleniny. Jedná se o důležitou plodinu díky výjimečné odolnosti vůči chladu (TANG J. *et al*, 2013). Bývá často zaměňována za pekingské zelí (*Brassica rapa ssp. pekinensis*), přestože rozdíl je zřejmý na první pohled. Zelí pekingské je tvořeno pevnou hlávkou kuželovitého tvaru a jeho listy nemají řapíky, zatímco čínské zelí netvoří hlávkou, ale rozevřenou listovou růžici, ze které vybíhají bílé, žlábkovité a křupavé stonky s tmavě zelenými řapíkatými listy lžičkovitého tvaru. Stonky jsou velmi chutné a šťavnaté, listy mají jemnou chuť. Přestože její listy mohou být konzumovány za syrova, častějším způsobem úpravy je smažení (TAMAR ORGANICS, 2018).



Obrázek 3. Odrůda Sagami (zdroj: doc. Ing. Eva Dadáková, Ph.D., katedra aplikované chemie, 2018)



Obrázek 4. Odrůda Golden Lion (zdroj: doc. Ing. Eva Dadáková, Ph.D., katedra aplikované chemie, 2018)

1.1.3. Tatsoi (*Brassica rapa ssp. rosularis*)

Tatsoi je rovněž listová zelenina původem z Číny. Objevují se i jiné názvy, jako „spinach mustard“, „spoon mustard“ (CHOI Y. J. *et al*, 2012) nebo „růžicová pak choi“, neboť její tmavě zelené lžičkovité listy a dlouhý dutý bílý stonek utvářejí mohutnou růžici. Nejčastější způsob konzumace je za syrova v různých míchaných salátech, ale můžeme se setkat také se smaženou formou (CREASY R., 1999).



Obrázek 5. Tatsoi (zdroj: doc. Ing. Eva Dadáková, Ph.D., katedra aplikované chemie, 2018)

1.2. Podmínky pěstování brukvovité zeleniny

Listová zelenina z čeledi brukvovitých je řazena do kategorie rostlin krátkého dne (tzv. krátkodenní). To znamená, že při zkracování dne do takové meze, jež je dána jejich potřebou k získání energie při fotosyntéze, urychlují svůj nástup do rozmnožovací (generativní) fáze (ŠETLÍK I. *et al*, 2004). Protože se pěstuje pouze pro listy, vyplývá z této skutečnosti fakt, že má krátkou vegetační dobu a tzv. vybíhání do květu je u ní nežádoucí. Z tohoto důvodu je nejvýhodnější zasévat až ve druhé polovině července nebo v srpnu, kdy se zkracuje den. V případě jarního výsevu je nutné rostliny opakovaně seřezávat (ABECEDA ZAHRADY, 2019).

Tyto druhy zeleniny mají poměrně chudý a slabý kořenový systém, proto je potřeba je pěstovat na dobře hnojených půdách s dostatkem rychle dostupných živin a vyšším pH. Důležitá je rovněž dostatečná zálaha, ale ne moc podmáčený terén. Vysévají se do řádků na vzdálenost přibližně 40 centimetrů, po dvou semínkách a do hloubky zhruba jeden centimetr. Po vzejití se dle odrůdy jednotí na vzdálenost 25 až 40 centimetrů. Vegetační doba se pohybuje od třech do jedenácti týdnů. Velikou výhodou je poměrně vysoká chladuvzdornost, u některých druhů dokonce odolnost vůči krátkodobým mrazíkům (IRECEPTAR, 2016).

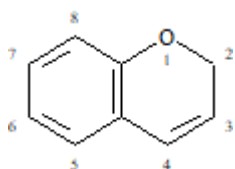
2. Rostlinné polyfenolické látky

Polyfenolické látky nebo také polyfenoly jsou skupinou chemických sloučenin, které jsou obsaženy v rostlinách. Je pro ně charakteristická přítomnost minimálně dvou fenolových jednotek v molekule. Polyfenoly bývají obecně děleny na lignany, hydrolyzovatelné tanniny neboli třísloviny a flavonoidy. Toto členění je odvozeno od variant polyfenolické jednotky vycházejících ze sekundárního metabolismu rostlin, ale také z významu jednotlivých základních komponent.

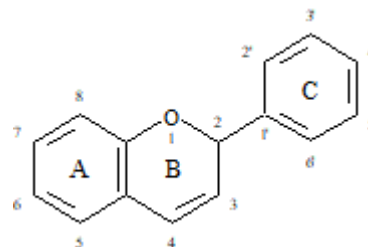
2.1. Flavonoidy

Flavonoidní látky neboli flavonoidy jsou součástí velmi rozsáhlé skupiny polyfenolických sloučenin, které jsou obsaženy především v ovoci a zelenině. Doposud bylo nalezeno více než deset tisíc různých struktur těchto látek, jež se dělí do několika skupin. Ovšem počet se stále zvyšuje důsledkem nálezů dalších struktur hlavně ve vyšších rostlinách, které jsou jejich nejrozšířenějším zdrojem (AGATI G. *et al*, 2012). Největší podíl flavonoidů se vyskytuje v nadzemních částech (semena a plody, květy, listy nebo kůra), nicméně nezanedbatelné množství lze nalézt i u některých částí podzemních, konkrétně v hlízách kuchyňské cibule (ORTEGA-GARCIA J. *et al*, 2015). Zřídka se vyskytují jako volné látky, nazývané aglykony, častěji pak ve formě glykosidů, acylovaných glykosidů, případně jako polymery.

Základní struktura většiny flavonoidů je odvozena z flavanu. Zpravidla se jedná o molekulu dvou benzenových kruhů A a C, spojených tříuhlíkovým řetězcem v uspořádání C₆-C₃-C₆, odvozenou od kyslíkaté heterocyklické sloučeniny zvané 2H-chromen. Tento typ sloučenin se též nazývá 1,3-diarylpropanoidy. Všechny tři kruhy jsou běžně substituovány buď hydroxyskupinami, nebo methoxyskupinami (FORMICA J. V., REGELSON W., 1995; VELÍŠEK J., HAJŠLOVÁ J., 2009b).



Obrázek 6. Struktura 2H-chromenu



Obrázek 7. Struktura flavanu

Podle substituentů na tříuhlíkovém řetězci a míry jeho oxidace rozdělujeme flavonoidy do následujících skupin (struktur): flavony, flavanony, flavonoly (dihydroflavony), flavanoly (flavan-3-oly), flavanonoly, anthokyanidiny a leukoanthokyanidiny (flavan-3,4-dioly). V několika málo případech se můžeme setkat i s variantou šestičlenného heterocyklického kruhu B, který může být nahrazen heterocyklickým kruhem s pěti uhlíky, nebo otevřenou formou. Tyto strukturně příbuzné látky rozeznáváme na chalkony, dihydrochalkony a aurony. V případě, že je kruh B spojený s kruhem C v poloze třetího uhlíku, rozdělujeme flavonoidy na isoflavonoidy (odvozené od isoflavanu) a neoflavonoidy, které jsou odvozené od neoflavanu (VELÍŠEK J., HAJŠLOVÁ J., 2009b).

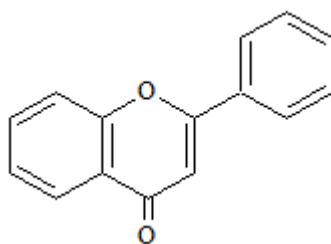
Protože se svými vlastnostmi značně liší od ostatních fenolických barviv, uvádějí se flavonoidy jako samostatná skupina rostlinných pigmentů. Mezi další rostlinné fenoly můžeme zařadit například chinoidní barviva nebo přírodní toxické látky (VELÍŠEK J., HAJŠLOVÁ J., 2009b).

Jako přírodní rostlinná barviva jsou důležité jen některé flavonoidy, další jsou významné svými biologickými účinky nebo pro svoji chuť (hořké a trpké látky či jejich prekurzory). Dříve byly děleny podle své barvy na červené až modré anthokyaniny (anthokyaniny) a žluté anthoxanthiny. Názvy byly utvořeny z řeckých slov *anthos* (květ), *cyaneos* (modrý) a *xanthos* (žlutý). Podle latinské terminologie *flavus* (žlutý) se dodnes používají názvy flavonů a dalších žlutých flavonoidů (VELÍŠEK J., HAJŠLOVÁ J., 2009b).

2.1.1. Flavony

Flavony patří společně s flavonoly k nejrozšířenějším žlutým pigmentům rostlin. Jedná se o silné rostlinné antioxidanty poukazující na svou antikarcinogenní aktivitu. Mezi nejvýznamnější zástupce flavonů substituovaných hydroxyskupinami řadíme apigenin a luteolin. Naopak z methoxyderivátů je hojný limocitrin nebo tangeretin, které se vyskytují v citrusích.

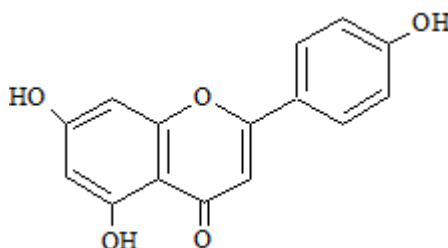
Nejvýznamnější nálezy flavonů indikujeme v celeru, petrželi, chmelu či v pšenici. V malém množství je lze pozorovat i v ovoci a zelenině (WELCH C. R. *et al*, 2008).



Obrázek 8. Základní struktura flavonů

2.1.1.1. Apigenin

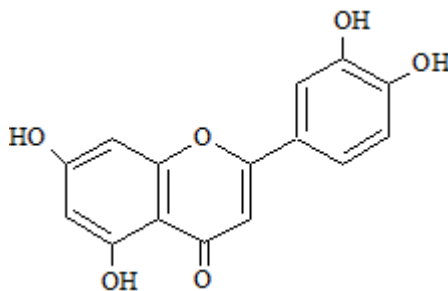
Apigenin je žlutá krystalická látka bohatě obsažená v petrželi, celeru, máte peprné nebo heřmánku. Jedná se o přírodní antioxidant, který má podle posledních výzkumů (SHUKLA S., GUPTA S., 2010) blahodárné účinky pro lidské tělo. Působí především jako prevence před vznikem nádorových onemocnění, proti zánětům, alergiím, ale také astmatu. V minulosti se mimo jiné používal i k barvení vlny (PATEL D. *et al*, 2007).



Obrázek 9. Apigenin

2.1.1.2. Luteolin

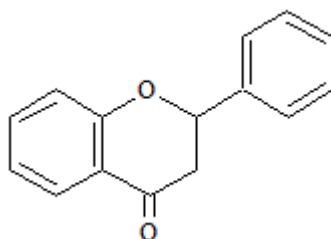
Luteolin je také žlutá krystalická látka, která má rovněž antikarcinogenní a protizánětlivé účinky. Nachází se v kořeni, jako například chilli, tymián, bazalka, rozmarýn, dále v citrusech, celeru, brokolici, cibuli a v černém čaji (KARAKAYA S., NEHIR S., 1998).



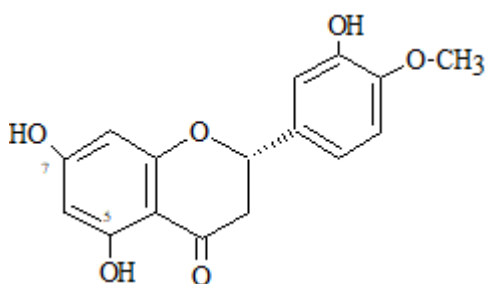
Obrázek 10. Luteolin

2.1.2. Flavanony

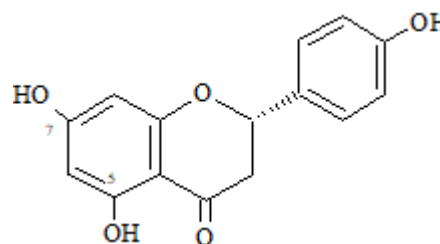
Flavanony jsou poměrně málo rozšířené látky s minimálním významem. Mají bezbarvé až světle žluté zbarvení. Vyskytují se převážně v citrusových plodech. Nejvýznamnějšími zástupci této skupiny jsou aglykony hesperetin, který je obsažen v citronech a pomerančích a naringenin, jež se vyskytuje v grapefruitech. Co se glykosidů týče, nejzastoupenějšími barvivy jsou hesperidin (hesperetin-7-rutinosid), naringin (naringenin-7-neohesperidosid) a sakuranin (sakuranetin-5-glukosid) (VELÍŠEK J., HAJŠLOVÁ J., 2009b).



Obrázek 11. Základní struktura flavanonů



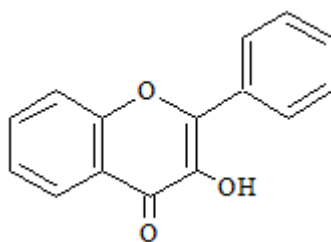
Obrázek 12. Hesperetin



Obrázek 13. Naringenin

2.1.3. Flavonoly

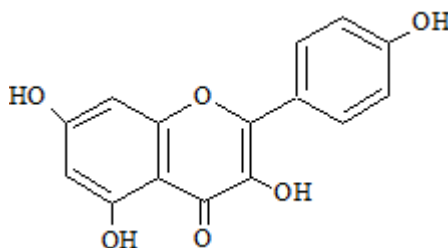
Flavonoly jsou důležitá žlutá barviva podobná flavonům, ale mají navíc připojenou hydroxylovou skupinu na tříuhlíkovém řetězci (obr. 14). Hlavními formami jsou *O*-glykosidy, aglykony se vyskytují v poměrně malém množství. K nejrozšířenějším flavonolům patří bezesporu kvercetin, dále kemferol a myricetin, z nichž jsou nejvíce rozšířené glykosidy prvních dvou zmíněných látek. Nejčastějšími cukernými složkami mohou být glukosa, rhamnosa, nebo galaktosa. Jako příklady můžeme uvést isokvercitrin nacházející se v borůvkách nebo spiraein, jež může být nalezen v kaštaněch a slupkách cibule. Hojně se rovněž vyskytuje rutin, kvercimeritrin, populnin a myricitrin. Kromě ovoce a zeleniny se větší množství flavonolů a jejich glykosidů nachází v čaji (VELÍŠEK J., HAJŠLOVÁ J., 2009b).



Obrázek 14. Základní struktura flavonolů

2.1.3.1. Kemferol

Kemferol nebo také kaempferol je rovněž žlutě zbarvený antioxidant, který inhibuje oxidaci lipoproteinů, a tím preventivně působí proti arterioskleróze. Rovněž účinkuje proti oxidačnímu poškození DNA, buněk nebo lipidů. Hojně se vyskytuje např. v citrusových plodech, borůvkách, brokolici, cibuli, pórku a v ginkgo bilobě neboli jinanu dvoulaločném (DEVI K. P. *et al*, 2015).

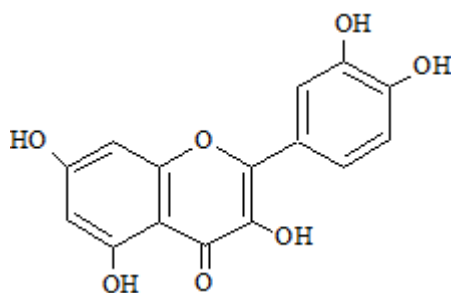


Obrázek 15. Kemferol

2.1.3.2. Kvercetin

Kvercetin, v zahraničních zdrojích quercetin, má jako jeden z nejrozšířenějších a nejúčinnějších flavonoidů široké spektrum účinků, kterými pomáhá bojovat proti různým druhům nemocí. Jakožto silný antioxidant působí proti zánětům, proti kardiovaskulárním onemocněním, jako je například trombóza nebo ateroskleróza, dále bojuje proti bakteriím a virům, astmatu nebo alergickým reakcím, kdy tlumí uvolňování histaminu z buněk. Zabraňuje dokonce i růstu některých rakovinotvorných buněk (CELOSTNÍ MEDICÍNA, 2017).

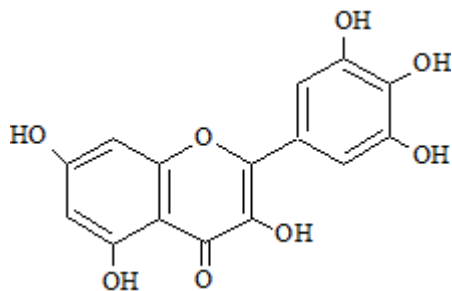
Nejbohatším zdrojem kvercetinu jsou zelené a barevné části rostlin, jako listy a plody, které se běžně konzumují. Jako příklady můžeme uvést červené víno (4-16 mg/kg), čajové lístky – černý nebo zelený čaj (10-25 mg/kg), jablka (21-72 mg/kg), kapustu (100 mg/kg) a cibuli (300 mg/kg). Všechny zmíněné hmotnosti jsou přepočteny na čerstvou hmotu (ERLUND I., 2004). Velikou výhodou je, že obsah flavonoidů zůstává i po tepelné úpravě či po zmrazení neměnný.



Obrázek 16. Kvercetin

2.1.3.3. Myricetin

Myricetin je sloučenina žlutého zbarvení rozpustná v alkoholu, která je obsažena v jahodách, čaji, červeném víně a také v zelenině. Snižuje obsah cholesterolu v krevním řečišti a je také vysoce účinný v léčbě průjmu, horečky nebo úplavice. Působí mimo jiné i proti leukemickým buňkám (SEMWAL D. K. *et al*, 2016).



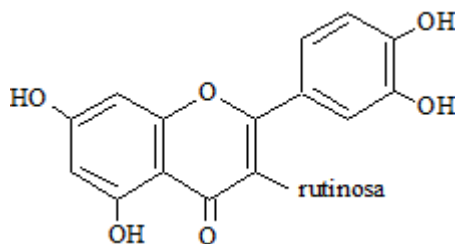
Obrázek 17. Myricetin

2.1.3.4. Rutin

Rutin, systematicky kvercetin-3- β -rutinosid, je nejvýznamnější derivát již zmíněného kvercetinu, který se řadí mezi bioflavonoidy a je žlutého až žlutozeleného zbarvení a vyskytuje se ve formě jehličkovitých krystalků (CELOSTNÍ MEDICÍNA, 2017). V minulosti byl označován jako vitamin P, jelikož se vyznačuje pozitivním účinkem na permeabilitu a pružnost krevních vlásečnic. Rovněž byly u této látky zjištěny protizánětlivé a antioxidační účinky.

Hojně se využívá ve farmaceutických produktech a doplňcích stravy, především díky schopnosti zvýšit hladinu kyseliny askorbové (vitaminu C) v živočišných orgánech. S dalšími flavonoidy slouží jako ochrana před její oxidací katalyzovanou ionty kovů, především Cu^{2+} a Fe^{3+} (VELÍŠEK J., HAJŠLOVÁ J., 2009b).

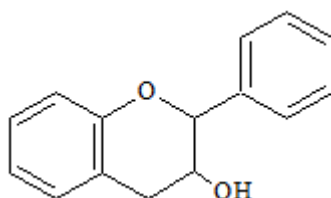
Nachází se především v citrusových plodech, jablkách a zelenině, výjimkou ovšem není ani černý čaj nebo pohanka, ve které se vyskytuje nejvyšší množství (CELOSTNÍ MEDICÍNA, 2017).



Obrázek 18. Rutin

2.1.4. Flavanoly

Flavan-3-oly se nacházejí ve dvou podobách, a to buď v monomerní podobě jako katechiny, nebo v polymerní podobě jako proanthokyanidiny. Strukturální vzorce flavanolů vycházejí ze struktury flavanu, jediným rozdílem je připojená hydroxylová skupina na tříuhlíkovém řetězci. Molekuly flavanolů tvoří takzvané proanthokyanidiny, jejichž struktura se velmi podobá anthokyanidinům, s výjimkou kladného náboje, který se nachází pouze u již zmíněných anthokyanidinů (HIGDON J. V., FREI B., 2003).

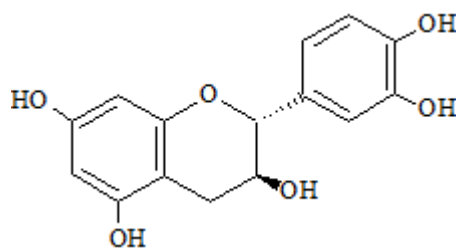


Obrázek 19. Základní struktura flavanolů

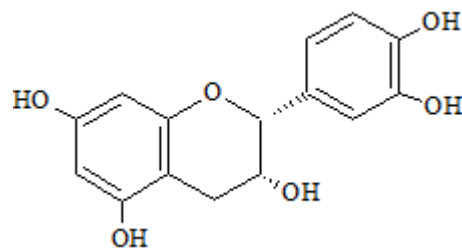
2.1.4.1. Katechiny

Katechiny a jejich účinky jsou již velmi dobře prozkoumané. K nejvýznamnějším patří prevence proti arterioskleróze, neboť katechiny snižují hladinu cholesterolu, dále snižují krevní tlak a působí i proti rakovinotvorným buňkám. Nejhojněji se nalézají v ovocných plodech, jako jsou jablka, hrušky, broskve, meruňky, hroznové víno, ale také v čaji nebo kakau (MANACH C., DONOVAN J. L., 2004). V mnoha studiích bylo prokázáno, že konzumace zeleného čaje snižuje riziko vzniku rakoviny jícnu, snižuje nebezpečí mutagenních pochodů v organismu, ale také působí preventivně proti vzniku zubního kazu tak, že tlumí aktivitu prvoků v ústech.

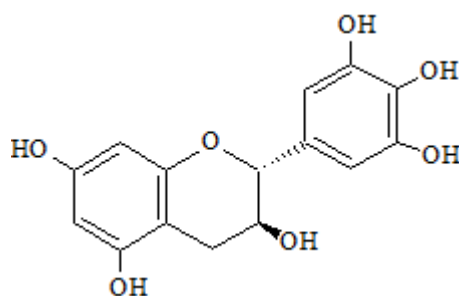
Mezi základní stavební jednotky těchto bezbarvých látek se kromě katechinu dále řadí epikatechin, gallokatechin a epigallokatechin (HIGDON J. V., FREI B., 2003).



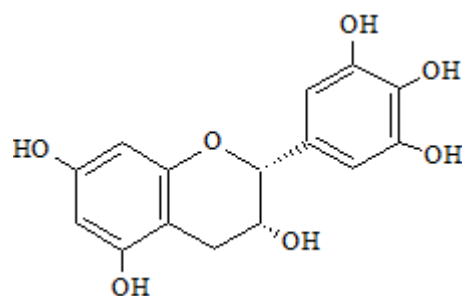
Obrázek 20. Katechin



Obrázek 21. Epikatechin



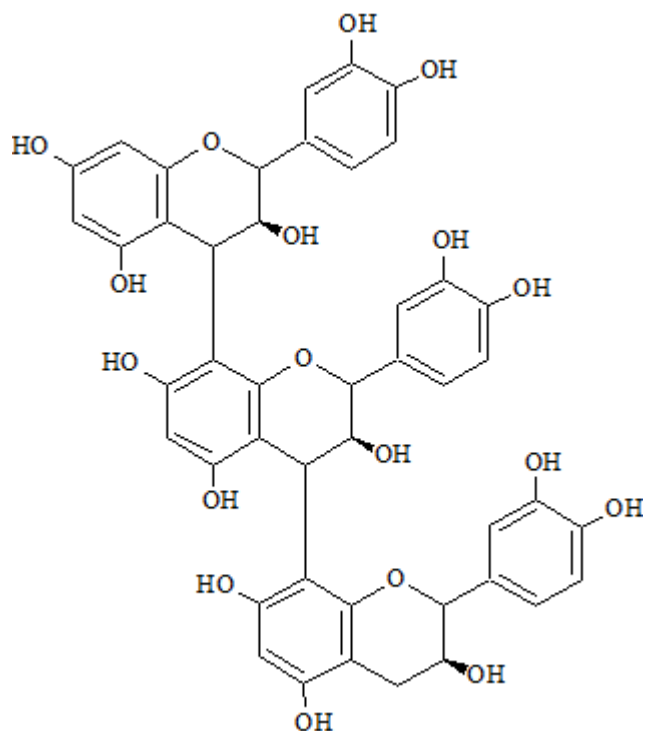
Obrázek 22. Gallokatechin



Obrázek 23. Epigallokatechin

2.1.4.2. Proanthokyanidiny

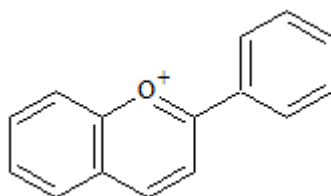
Proanthokyanidiny jsou dimery, oligomery případně i polymery flavanolů, konkrétně katechinu. Jednotky jsou spojeny mezi uhlíky C4 a C8 (obr. 24). Používá se pro ně i druhý název, a to kondenzované tanniny (MANACH C. *et al*, 2004).



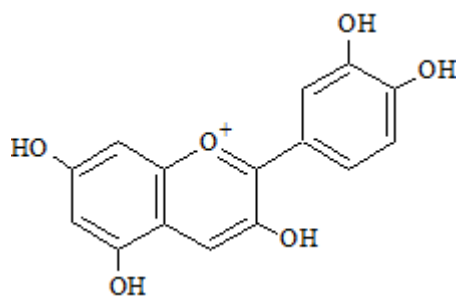
Obrázek 24. Proanthokyanidin (trimer)

2.1.5. Anthokyanany a anthokyanidiny

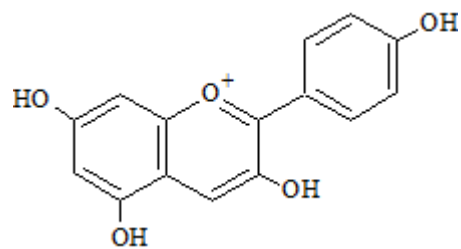
Anthokyanany, jinak nazývané anthokyaniny, patří mezi jednu z nejpočetnějších a nejrozšířenějších skupin rostlinných barviv rozpustných ve vodě. Jedná se o glykosidy aglykonů, jež se nazývají anthokyanidiny a jejichž struktura je odvozena od flavyliového kationtu (2-fenylbenzopyryliový nebo 2-fenyl-chromenyliový kation). Přestože existuje sedmnáct různých anthokyanidinů, v potravním průmyslu je významných pouze šest sloučenin, které mají na tříuhlíkovém řetězci navázanou hydroxylovou skupinu. Mezi ně řadíme kyanidin (fialový), pelargonidin (šarlatový), peonidin (fialový), delphinidin (purpurově modrý), petunidin (purpurově modrý) a malvidin (purpurový) (obr. 26-31) (VELÍŠEK J., HAJŠLOVÁ J., 2009b).



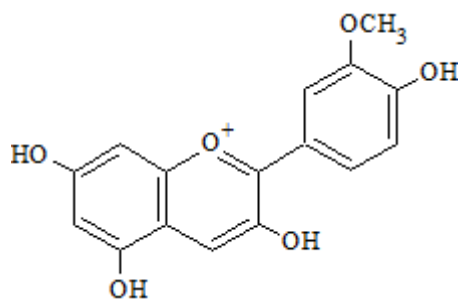
Obrázek 25. Základní struktura anthokyanidinů



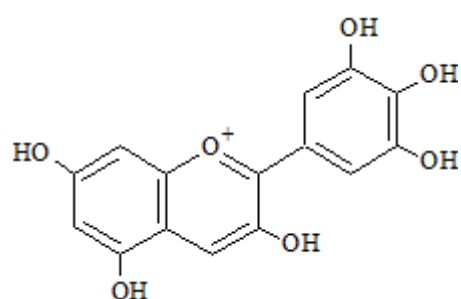
Obrázek 26. Kyanidin



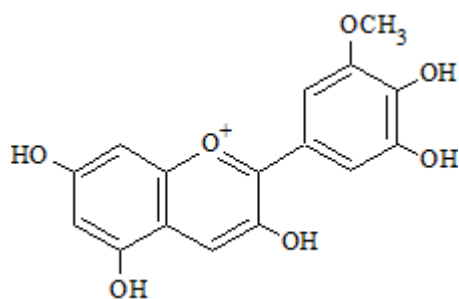
Obrázek 27. Pelargonidin



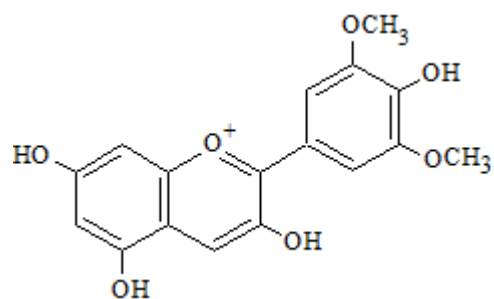
Obrázek 28. Peonidin



Obrázek 29. Delfinidin



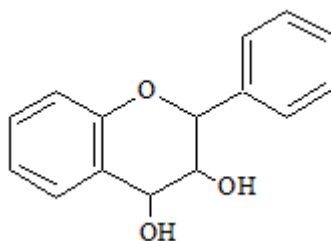
Obrázek 30. Petunidin



Obrázek 31. Malvidin

2.1.6. Leukoanthokyanidiny

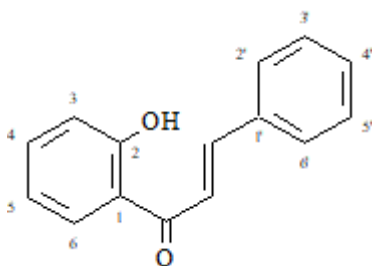
Leukoanthokyanidiny, strukturně flavan-3,4-dioly, jsou bezbarvé sloučeniny podléhající enzymovému hnědnutí, podobně jako katechiny. Při zpracování ovoce nebo zeleniny v kyselém prostředí z nich mohou vznikat příslušné anthokyanidiny (VELÍŠEK J., HAJŠLOVÁ J., 2009b).



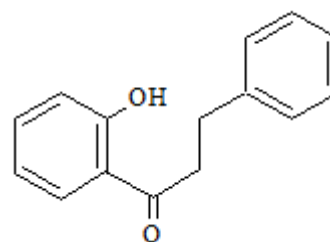
Obrázek 32. Základní struktura leukoanthokyanidinů

2.1.7. Chalkony a dihydrochalkony, aurony

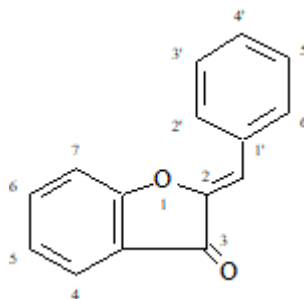
Chalkony, dihydrochalkony a aurony jsou významné pouze jako barviva květů, dřevní hmoty nebo semen luštěnin, neboť v potravinářsky významných rostlinných částech nejsou příliš zastoupeny. Některé chalkony byly nalezeny i v chmelových šišticích. Dříve byly nazývány anthochlory nebo také anthochlorové pigmenty. Co se zástupců týče, nejčastějším chalkonem je butein, z dihydrochalkonů je nejvíce zastoupený floretin a nejrozšířenější aurony se nazývají hispidol, sulfuretin a aureusidin (VELÍŠEK J., HAJŠLOVÁ J., 2009b).



Obrázek 33. Základní struktura chalkonů



Obrázek 34. Základní struktura dihydrochalkonů



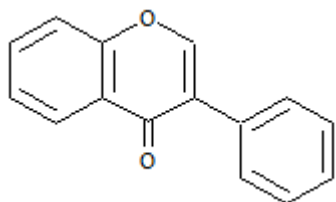
Obrázek 35. Základní struktura auronů

2.1.8. Isoflavonoidy a neoflavonoidy

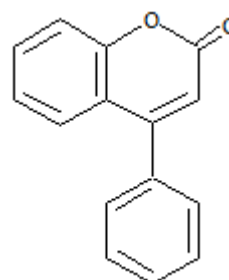
Isoflavonoidy a jejich deriváty bývají někdy označovány jako fytoestrogeny (OSOSKI A. L., KENNELLY E. J., 2003). Jsou typickými sekundárními metabolity rostlin čeledi bobovitých (*Fabaceae*) (REYNAUD J. *et al*, 2005). Jedná se o poměrně rozsáhlou skupinu čítající okolo pěti tisíc struktur dále dělených do následujících podskupin: isoflavony, isoflavanony, isoflavany, isoflavanoly, isoflavanchinony, isoflav-3-eny, rotenoidy, dihydrorotenoidy, 12a-hydroxyrotenoidy, pterokarpany, 6a-hydroxypterokarpany, pterokarpeny, kumestany, kumaronochromony, 2-arylbenzofurany a 3-arylkumariny (VEITCH N., 2007). V největším množství se vyskytují jako aglykony v rostlinných částech jako kůra, dřevo nebo kořeny (REYAUD J. *et al*, 2005). Jejich obsah je ovšem ovlivněn řadou faktorů zahrnující

vlastnosti půdy, klimatické podmínky, druh, stáří rostliny apod. (DAKORA F. D., PHILLIPS D. A., 1996).

Neoflavonoidy, jak již bylo zmíněno na začátku kapitoly, mají strukturu odvozenou od neoflavanu, která byla objevena v 60. letech minulého století. Tyto sloučeniny byly izolovány z rostlin rodu *Machaerium* a *Dalbergia*, které náleží do čeledi bobovitých (OLLIS W. D., 1966).



Obrázek 36. Základní struktura isoflavonoidů



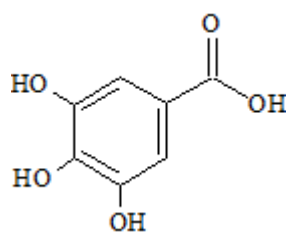
Obrázek 37. Základní struktura neoflavonoidů

2.2. Tanniny

Tanniny, jinak nazývané třísloviny, jsou fenolové sloučeniny zapříčiňující trpkou chuť v potravinách rostlinného původu. Členíme je do dvou velkých skupin, konkrétně na hydrolyzovatelné třísloviny a kondenzované třísloviny. Jelikož často významným způsobem ovlivňují chuťové vlastnosti potravin, jsou třísloviny v potravinách poměrně důležité. Mezi žádoucí vlastnosti řadíme například trpkost piva, červeného vína, čaje nebo kávy, naopak mezi nežádoucími vlivy je trpkost nezralých ovocných plodů. Dokážou reagovat s proteiny a srážet je z vodných roztoků, což se uplatňuje při poškození rostlinných pletiv. V hojném množství je lze nalézt v semenech luštěnin, především fazolí a sóji (VELÍŠEK J., HAJŠLOVÁ J., 2009b).

2.2.1. Hydrolyzovatelné tanniny

Hydrolyzovatelné tanniny je možno dále rozdělit na takzvané gallotanniny a ellagotanniny. Tyto sloučeniny mají poměrně složitou strukturu, neboť se jedná o deriváty 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- β -D-glukopyranosy s gallovou kyselinou (obr. 38), která je vázána na D-glukosu esterovými vazbami. V průběhu biosyntézy vznikají oxidací dvou sousedních zbytků kyseliny gallové již zmíněné ellagotanniny (VELÍŠEK J., HAJŠLOVÁ J., 2009b).



Obrázek 38. Kyselina gallová

Co se gallotanninů týče, získávají se z duběnek pod označením tříslová kyselina nebo tannin a našly uplatnění v potravinářství, kde se používají k prevenci proti vzniku bílkovinných zákalů v octu, pivě nebo víně (VELÍŠEK J., HAJŠLOVÁ J., 2009b).

2.2.2. Kondenzované tanniny

Kondenzované tanniny, též zvané proanthokyanidiny, někdy také tannoidy. Jejich oligomery čítající 2-10 základních jednotek (katechinů) dávají čaji nebo ovoci hořkou chuť. Vyskytují se především v černém čaji, ale také v hroznech, konkrétně v jejich semenech (VELÍŠEK J., HAJŠLOVÁ J., 2009b).

2.3. Lignany

Lignany jsou polyfenolové sloučeniny řazené mezi takzvané fenyylpropanoidy. Jedná se o dimery s uspořádáním C₆-C₃-C₃-C₆. V současné době je známo přes dvě stě různých struktur, jež se dělí do čtyř následujících skupin: lignany, lignanolidy, monoepoxylignany a bisepoxylignany. Patří k nejrozšířenějším složkám rostlin, ve kterých slouží jako ochrana proti patogenům. Mimo jiné slouží i jako antioxidanty, antikarcinogenní látky a fytoestrogeny. Nalézt je můžeme například u celozrnných výrobků z obilovin, v sezamovém oleji, luštěninách, rýži, ovoci a zelenině nebo v ořeších (VELÍŠEK J., HAJŠLOVÁ J., 2009b).

3. Analytická separační metoda - HPLC

Chromatografie je jednou z nejvýznamnějších analytických separačních metod. Umožňuje jak dělení, identifikaci, tak i následné stanovení velkého počtu organických i anorganických látek. Podstatou je rozdělování složek mezi dvě fáze, a to fázi pohyblivou neboli mobilní a nepohyblivou (stacionární) fázi. Pohyblivá fáze využívá plyn nebo kapalinu, zatímco nepohyblivá může mít více rozdílných forem, jako například částičky tuhé fáze o velikosti jednotek až stovek mikrometrů, kapalinu na povrchu inertního nosiče nebo film kapaliny na vnitřní stěně kapiláry (KŘÍŽEK M., ŠÍMA J., 2015).

Jako první chromatografická metoda byla objevena kapalinová chromatografie, jíž položil základy na počátku 21. století Michail Semionovič Cvet (1872-1919), botanik rusko-italského původu, který roku 1903 na sloupci sorbentu úspěšně rozdělil listová barviva. Ovšem na popředí zájmu se dostala až o 60 let později, kdy díky rozvoji instrumentace prošla modernizací a dospěla až do dnešní vysokoúčinné podoby (ŠTULÍK K., 2004).

V současné době rozlišujeme několik druhů kapalinové chromatografie: papírovou – PC (Paper Chromatography), tenkovrstvou – TLC (Thin Layer Chromatography) a vysokoúčinnou chromatografii – HPLC (High Performance Liquid Chromatography), která je nejvíce využívána pro své široké spektrum použitelnosti. Rozdílem mezi těmito typy je systém – u prvních dvou zmíněných metod se jedná o systém otevřený (plošný), ale u HPLC je uzavřený (kolonový) (KŘÍŽEK M., ŠÍMA J., 2015).

Pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie je možno analyzovat velké množství látek, od polárních a nepolárních, přes nízko- či vysokomolekulární, stabilní a těkavé, až po ionty. Separace je závislá na mnoha faktorech, mezi něž patří vlastnosti a složení stacionární a mobilní fáze, dále typ analyzované látky a její interakce s výše zmíněnými fázemi a v neposlední řadě také parametry analytických přístrojů (dávkovací zařízení, kolona a detektor) (ŠTULÍK K., 2004).

3.1. Základní pojmy

Mobilní fáze neboli také pohyblivá libovolná kapalina.

Stacionární fáze, jinak nepohyblivá, pro zjednodušení se užívá termín sorbent.

Retenční čas je doba, kterou analyzovaná látka stráví v koloně.

Redukovaný retenční čas je doba, kterou analyt stráví v koloně.

Retenční objem je objem nutný k přechodu analytu celou kolonou (od začátku až do konce).

Gradientová eluce je stav, při němž se mění složení mobilní fáze během analýzy.

(KRÍŽEK M., ŠÍMA J., 2015)

3.2. Stacionární fáze HPLC

Stacionární neboli nepohyblivá část spočívá v separaci částic, na kterou má největší vliv jejich velikost a uspořádání v náplňových kolonách. Nejúčinnější proto je, pokud částice jsou částice pravidelného, ideálně kulovitěho tvaru, stejně veliké a tvoří v koloně homogenní směs. Nejčastěji je kolona na bázi silikagelu, jež se vyznačuje vysokou pórovitostí. Obsahuje mezipóry, dodávající velký povrch pro interakci s analyty, ale také mikropóry, které umožňují používání vysokých průtoků (až 9 ml/min). K odstranění vířivé difúze se používají takzvané monolitické stacionární fáze, nabízející celistvější zaplnění prostoru. V tomto případě je kolona zcela naplněna organickým, nebo anorganickým polymerem o přesně definované pórovitosti, vytvořeným vhodnou polymerační reakcí v roztoku. Tyto kolony jsou odolné vůči změnám pH a mechanicky stabilní (KLOUDA P., 2003).

Zcela novým typem stacionárních fází, které jsou obdobou monolitických kolon, jsou takzvané vtištěné polymery (imprinted polymers). Hlavní rozdíl se zakládá v zabudování „obtisku“ analytu, jež je potřeba oddělit, do náplně. Tento proces probíhá během přípravy polymeru v koloně, kdy se k němu přidá analyzovaná látka, a po ukončení polymerace se tento analyt z kolony vymyje, přičemž v koloně vznikne příznačná dutina sloužící k zachycení pouze dané látky (ŠTULÍK K., 2004).

3.3. Mobilní fáze HPLC

Pohyblivá či mobilní fáze, význačně podílející se na procesu separace, není v kapalinové chromatografii inertní. Složení této fáze může být ovlivněno mnoha faktory, mezi něž řadíme změny pH, složení rozpouštědel a iontovou sílu. Charakteristické vlastnosti mobilní fáze jsou především její selektivita a polarita, které jsou velice důležité v první řadě z hlediska separace a detekce. Důvodem je umožnění co nejcitlivější detekce solutů, proto by měla mobilní fáze splňovat co možná nejnižší hodnoty viskozity, stlačitelnosti, míry absorpce ultrafialového záření a také toxicity (VOLKA K., 1995).

3.4. Instrumentace v kapalinové chromatografii

Přístroje používané pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii se nazývají kapalinové chromatografy a skládají se z několika součástí: čerpadla, dávkovacího zařízení, kolony, detektoru a na něj napojeného vyhodnocovacího zařízení, kterým je v současné době téměř vždy počítač s vyhodnocovacím programem a hardwarovou úpravou (KŘÍŽEK M., ŠÍMA J., 2015).

3.4.1. Čerpadlo

Před vstupem do čerpadla se mobilní fáze nejprve přivede přes odplyňovač, který eliminuje vznik bublin v detektoru a následně přes filtr. V kapalinové chromatografii se běžně pracuje s velmi vysokými tlaky v rozmezí 1-60 MPa a průtoky mobilní fáze od 0,1 do 10 ml/min. Tyto parametry představovaly v minulosti problém s dávkováním do kolony bezpulzním způsobem. Řešení bylo nalezeno s použitím lineárního dávkovače, jehož mechanismus by se dal přirovnat k funkci injekční stříkačky. Dnes je možné využít dvou typů čerpadel, konkrétně jednopístového, který zajišťuje bezpulzní, avšak diskontinuální tok a mnohopístového, jež se vyznačuje sice kontinuálním, nicméně pulzním tokem mobilní fáze (KŘÍŽEK M., ŠÍMA J., 2015; ŠTULÍK K., 2004).

Rozlišujeme dva typy elucí. Prvým způsobem je takzvaná isokratická eluce, během které je mobilní fáze po celou dobu konstantní a je vedena pouze z jednoho zásobníku do vysokotlakého čerpadla, ovšem přes odplyňovač. Druhým typem je gradientová eluce, jejíž mechanismus spočívá ve vedení komponentů z mobilní fáze do směšovače, kde dochází k mísení v zadaném poměru a následné převedení do kolony přes tlumič pulzů čerpadla, takzvaný depulzátor (CHURÁČEK J., 1990; KŘÍŽEK M., ŠÍMA J., 2015).

3.4.1.1. Dávkování

U HPLC existují tři způsoby dávkování vzorků. Prvním je dávkování mikrostríkačkou přes septum, nicméně tento typ se využívá velmi zřídka. O něco běžnějším způsobem je nástřik mikrostríkačkou pomocí ventilu, při kterém dochází k dočasnému rozpojení systému čerpadla s kolonou. Posledním a zároveň nejrozšířenějším postupem je použití šesticestného kohoutu s dávkovací smyčkou o známém a konstantním objemu. Tento mechanismus pracuje ve dvou polohách:

při první se smyčka naplní vzorkem a při přepnutí do druhé je umožněn průtok vzorku do kolony (KŘÍŽEK M., ŠÍMA J., 2015).

3.4.2. Kolona

Kolony pro kapalinovou chromatografii jsou rovné, o délce nejčastěji 10-20 cm a vnitřním průměru mezi 0,2 až 2 cm. Vyrábějí se převážně z nerezové oceli, ale mohou se vyrábět také ze speciálního skla nebo safíru. Jejich náplň, zvaná sorbent, obsahuje zrna o velikosti 3-50 μm , ovšem nejčastěji v rozpětí 5-10 μm a vyžaduje profesionální zavedení. Jako ochrana před rychlejším znehodnocením se používají takzvané předkolony (KŘÍŽEK M., ŠÍMA J., 2015).

3.4.3. Detektor

Mobilní fáze vychází z kolony s eluentem neboli určitou složkou analyzované směsi, která je zpracována detektorem. Mezi nejpoužívanější patří průtokový fotometrický či fluorimetrický. Méně běžnými druhy jsou pak refraktometrický nebo elektrochemický detektor (KŘÍŽEK M., ŠÍMA J., 2015). Univerzálním detektorem je hmotnostní spektrometr. Základními vlastnostmi signálu detektoru by měly být zejména jeho stabilita, dále reprodukovatelnost a v neposlední řadě také lineární závislost na koncentraci, a to v co nejširším rozsahu. Citlivost závislosti odezvy na koncentraci by měla být co nejvyšší. Oproti tomu mez detekce neboli koncentrace analytu by měla být co nejnižší.

Elektrochemický detektor je založen na principu měření elektrické vodivosti eluátu mezi dvěma elektrodami se střídavým napětím eliminujícím jejich polarizaci. Využívají se k detekci iontových látek, analýze fenolů a aromatických aminů (CHURÁČEK J., 1993; ŠTULÍK K., 2004).

Fluorimetrický detektor je velice selektivní pro přirozeně fluorescenční látky, případně látky na jejich deriváty převeditelné. Dochází v něm k ozařování analytu excitujícím zářením nebo také určitou vlnovou délkou vycházející ze zdroje, jímž může být laser, deuteriová, wolframová nebo xenonová lampa, případně rtuťová výbojka, který vydává emitované záření neboli záření o větší vlnové délce. Uplatnění nacházejí při stopové analýze (ŠTULÍK K., 2004).

Fotometrický detektor patří k nejpoužívanějším detektorům v kapalinové chromatografii. Jeho činnost spočívá v registraci absorpce ve viditelné až ultrafialové oblasti barevného spektra. Velikou výhodou těchto detektorů je provozní spolehlivost, jednoduchost a poměrně široká škála použitelnosti. Největší uplatnění našly dvoupráskové spektrofotometry s průtokovou detekční celou. Zde je kladen důraz na zachování potřebné citlivosti při detekci, tudíž cela musí při dostatečně dlouhé optické dráze splňovat malé rozměry. Během použití detekční vlnové délky je důležitá nízká absorbance mobilní fáze. Významné jsou tyto detektory mimo jiné při určení homogenity píku (CHURÁČEK J., 1993).

Refraktometrický detektor je na jednu stranu význačný svou univerzálností, ale na stranu druhou je velmi málo citlivý. Je založen na měření rozdílu indexu lomu solutu mobilní fáze vůči mobilní fázi. Index lomu je poměrně závislý na teplotě, tudíž zde nelze využít gradientovou eluci, což představuje nevýhodu (ŠTULÍK K., 2004).

III. Cíle práce

Cílem této bakalářské práce je:

(1) vypracování literární rešerše se zaměřením na aktivní rostlinné látky, jejich výskyt v potravinách a důležitost ve výživě se zaměřením na listovou zeleninu,

(2) na základě literární rešerše navržení sortimentu druhů netradiční listové zeleniny, pořízení experimentálního materiálu z vybraných druhů pěstováním v zahradních podmínkách a úprava k následné analýze,

(3) u těchto vzorků stanovení obsahu vybraných látek metodou HPLC,

(4) vyhodnocení získaných výsledků.

IV. Experimentální část

1. Použité chemikálie a přístroje

1.1. Chemikálie

kyselina askorbová (Merck, Německo)

methanol (Merck, Německo)

kyselina chlorovodíková (Lachema, Česká republika)

kyselina α -naftyloctová (Lachema, Česká republika)

hydrogenuhličitan sodný (Lachema, Česká republika)

acetonitril (Merck, Německo)

kvercetin (Aldrich Chemie, Německo)

kemferol (Aldrich Chemie, Německo)

apigenin (Aldrich Chemie, Německo)

luteolin (Aldrich Chemie, Německo)

myricetin (Aldrich Chemie, Německo)

morin (Aldrich Chemie, Německo)

Všechny použité chemikálie měly analytickou čistotu.

1.2. Laboratorní sklo a přístroje

základní laboratorní vybavení (Fischer Scientific, Pardubice, Česká republika)

laboratorní nožový mlýn Grindomix GM 200 (Retsch, Německo)

lyofilizátor Alpha 1-2/LD plus (Christ, Německo)

chladnička s ledničkou (Bosch Cooler, Německo)

analytické váhy AB204 (Mettler Toledo, Švýcarsko)

vodní lázeň termostatovaná míchaná EL-20R (Kavalier, Česká republika)

odstředivka Sigma 2-5 (Sigma Zentrifugen, Německo)

filtry ze skleněných vláken GF/C (Whatman, Velká Británie)

SPE kolonky RP-18 (Merck, Německo)

kapalinový chromatograf Agilent 1200 Series Rapid Resolutions (Agilent, USA)

kolona Zorbax Eclipse SB-C18 (Agilent, USA)

2. Příprava rostlinného materiálu

Všechny testované vzorky listové zeleniny (Namenia, Sagami, Golden Lion a Tatsoi) byly vypěstovány na pokusném školním pozemku Zemědělské fakulty v kampusu Jihočeské univerzity (České Budějovice, N 48°58'29.528", E 14°26'52.057") v roce 2018. Osiva byla zakoupena u firmy Semena.cz. Všechny testované odrůdy byly vypěstovány volně v běžně upravené zemině na ploše pozemku. Zelenina nebyla během vegetace hnojena ani chemicky ošetřována.

Po sklizni byl rostlinný materiál pečlivě očištěn a byly z něj odebrány jedlé, běžně konzumované části, to znamená zelené nadzemní. Všechn rostlinný materiál byl následně nakrájen na části o maximální tloušťce 0,5 cm, okamžitě zamražen při teplotě -16 °C a do 1 měsíce od odběru po dobu 24 hodin lyofilizován při tlaku 0,1 mbar a teplotě -50 °C. Poté byl lyofilizovaný materiál na laboratorním mlýnku homogenizován a do analýzy uložen v plastových vzorkovnicích v mrazícím boxu o teplotě -16 °C.

3. Metodika zpracování vzorků

V rostlinném materiálu jsou molekuly flavonoidních aglykonů v naprosté většině případů vázány na sacharid a vytvářejí tím takzvané glykosidické formy. Oproti tomu je výskyt volných aglykonů téměř zanedbatelný. V přírodních materiálech je velmi obtížné stanovit jednotlivé obsahy konkrétních glykosidů, neboť jejich množství od každého aglykonu je obrovské. Na druhou stranu, počet jednotlivých aglykonů vytvářejících glykosidy je podstatně nižší. Podle celkového obsahu konkrétních flavonoidních aglykonů se dá posoudit množství všech forem flavonoidních glykosidů.

Z tohoto důvodu byla zvolena taková metoda, při níž jsou vzorky podrobeny kyselé hydrolyze, díky jejímuž prostředí jsou všechny aglykony uvolněny rozštěpením přítomných glykosidů (DADÁKOVÁ E. *et al*, 2001). Volné aglykony byly ze vzorku izolovány metodou sorpce na tuhé fázi (SPE) a stanoveny metodou HPLC.

Bylo sledováno celkem šest nejběžnějších flavonoidních aglykonů, konkrétně kvercetin, kemferol, myricetin, apigenin, luteolin a morin.

4. Stanovení flavonoidních aglykonů

Stanovení vybraných flavonoidů bylo provedeno metodou vyvinutou na pracovišti (DADÁKOVÁ E., KALINOVÁ J., 2010), kde byla tato bakalářská práce vytvořena. Směs přibližně 0,25 g homogenního a lyofilizovaného materiálu s 80 ml kyseliny askorbové, 5 ml 6M kyseliny chlorovodíkové (HCl), 12,5 ml methanolu a 7,5 ml destilované vody byla hydrolyzována po dobu dvou hodin v 500ml baňce pod zpětným chladičem a na vodní lázni při teplotě 90 °C. Po vychlazení byl obsah baňky zneutralizován 2 g hydrogenuhličitanu sodného (NaHCO₃), poté pomocí 12,5 ml methanolu (CH₃OH) a vody převeden do odstředivací kyvety a postupně třikrát odstředěn při 3000 otáčkách a době trvání 10 minut (1 cyklus). Následně byly v 600ml kádince vzniklé supernatanty doplněny vodou na 200 ml a s pomocí nasyceného roztoku NaHCO₃ bylo pH upraveno na hodnotu 3. Takto upravený roztok byl filtrován za sníženého tlaku přes filtr ze skleněných vláken. Filtrát byl poté kvantitativně převeden do 500ml odměrné baňky.

Před sorpcí na SPE kolonkách byly všechny roztoky desetkrát naředěny připraveným 5% roztokem methanolu a takto připraveny mohly být použity na tuhé SPE fázi. Byly použity kolonky RP-18 (Merck), které byly kondicionovány promytím 10 ml methanolu a 10 ml vody. Po promytí vzorků byly kolonky promyty 10 ml vody a následně sušeny procházejícím vzduchem po dobu 20ti minut. Zachycené látky byly s pomocí 1,4 ml methanolu vymyty do měrné vialky. K eluátu v měrné vialce byl přidán roztok vnitřního standardu, kterým byla zvolena kyselina α -naftyloctová o koncentraci 2 mg/ml a v množství 100 μ l.

Všechny vzorky byly měřeny na vysokoúčinné kapalinové chromatografii. Byl použit kapalinový chromatograf typu Agilent 1200 Series Rapid Resolutions americké firmy Agilent Technologies s kolonou Zorbax Eclipse SB-C18 s parametry 4,6x50 mm a zrněním 1,8 μ m, rovněž značky Agilent. Jako mobilní fáze byly použity dvě různé směsi. První byla tvořena 5% acetonitrilem, 0,1% kyselinou mravenčí a vodou. Druhým typem mobilní fáze byla 0,1% kyselina mravenčí s acetonitrilem. Analýza probíhala po dobu 15ti minut při teplotě 25 °C, průtok mobilní fáze činil 1 ml/min, objem nástřiku 5 μ l a mez detekce analytu byla nastavena na 270 nm.

Pro analytickou odezvu byl použit poměr ploch píků identifikovaných druhů flavonoidů, především kvercetin a kemferolu ku vnitřnímu standardu. Kvantifikace obsahu se provedla pomocí kalibrační závislosti, pro jejíž sestavení sloužily roztoky připraveny z roztoků zásobních v pracovním rozsahu 5-100 µg/ml. Mez detekce byla 1 mg/kg, mez stanovitelnosti 5 mg/kg sušiny. Všechny vzorky byly analyzovány dvakrát, výsledek je aritmetickým průměrem, je uvedena směrodatná odchylka.

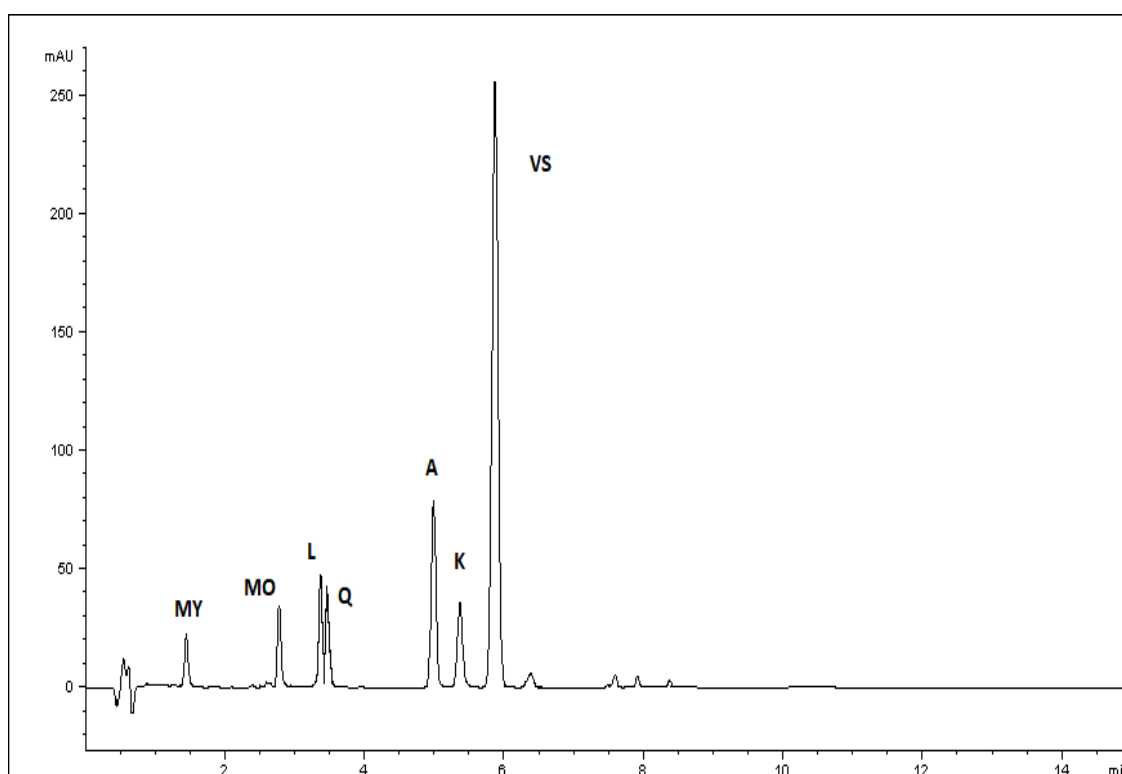
5. Použité statistické metody

Vyhodnocení naměřených dat bylo provedeno s použitím programu ChemStation 3 (Agilent) a matematicko-statistických nástrojů programu MS Office Excel 2016. Jako popisné charakteristiky byly využity: průměrná hodnota a směrodatná odchylka.

V. Výsledky a diskuse

Pro tuto práci byly zkoumány celkem čtyři druhy netradiční listové zeleniny z Asie pěstované ve dvou režimech. První osev proběhl v květnu 2018, druhý osev pak v srpnu 2018. K analýze byl použit lyofilizovaný materiál.

Z flavonoidů byly ke sledování vybrány flavonoly, konkrétně kvercetin, kemferol, myricetin a morin, dále flavony apigenin a luteolin, protože se v zelenině vyskytují nejčastěji. Jako vnitřní standard byla použita α -naftyloctová kyselina.



Obrázek 39. Záznam analýzy standardního měření aglykonů

| Symbol v chromatogramu | Sloučenina |
|------------------------|------------------|
| MY | Myricetin |
| MO | Morin |
| L | Luteolin |
| Q | Kvercetin |
| A | Apigenin |
| K | Kemferol |
| VS | Vnitřní standard |

Tabulka 1. Legenda ke značkám ve chromatogramech

Vybrané flavonoidní aglykony ve vzorcích listové zeleniny byly identifikovány srovnáním se standardem. Na následujících chromatogramech jsou zobrazeny záznamy analýz jednotlivých vzorků.

Pro účely porovnání naměřených obsahů jednotlivých aglykonů s ostatními výzkumy byla použita data o sušině materiálu, získaného lyofilizací jednotlivých vzorků v přepočtu na čerstvou hmotu.

| osev | vzorek | čerstvý materiál (g) | lyofilizovaný materiál (g) | sušina (%) |
|----------|-------------|----------------------|----------------------------|------------|
| Jarní | Namenia | 326,1 | 30,01 | 9,20 |
| | Sagami | 332,9 | 28,15 | 8,46 |
| | Golden Lion | 314,6 | 20,36 | 6,47 |
| | Tatsoi | 318,2 | 24,94 | 7,84 |
| | | | | |
| Podzimní | Namenia | 64,71 | 7,45 | 11,5 |
| | Sagami | 156,36 | 16,69 | 10,7 |
| | Golden Lion | 150,05 | 11,6 | 7,73 |
| | Tatsoi | 84,18 | 8,81 | 10,5 |

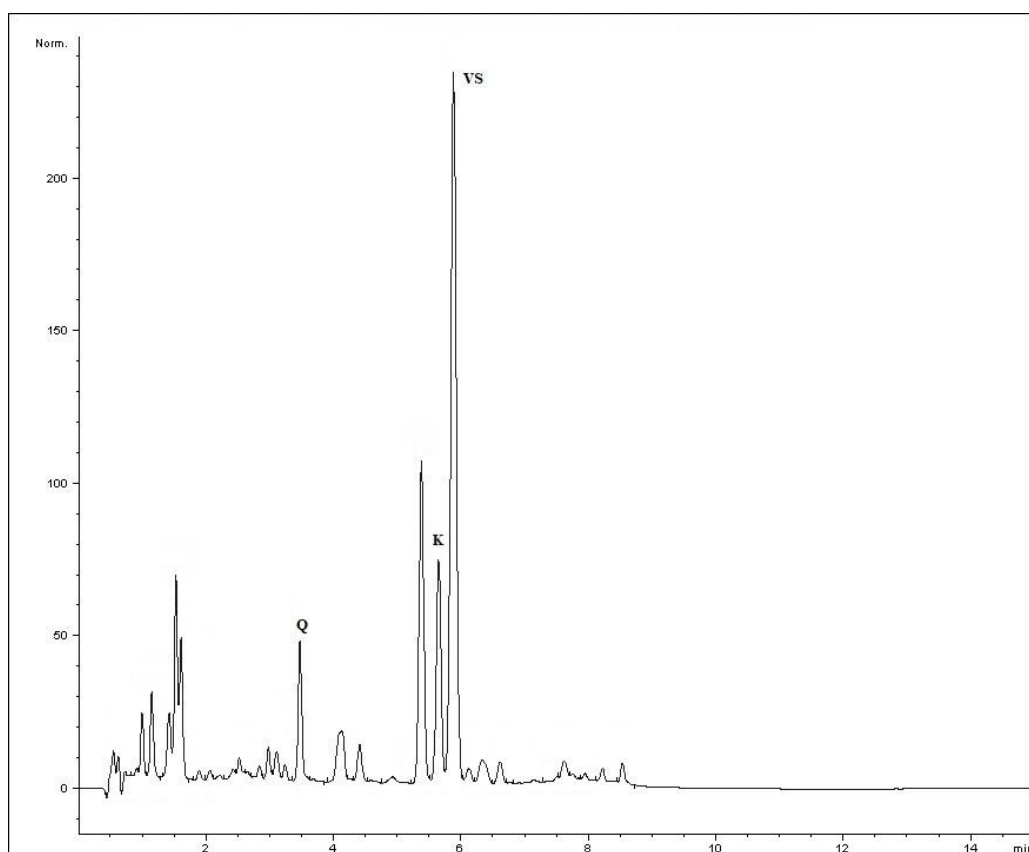
Tabulka 2: Stanovení sušiny listové zeleniny

1. *Namenia* (*Brassica rapa* var. *rapa*)

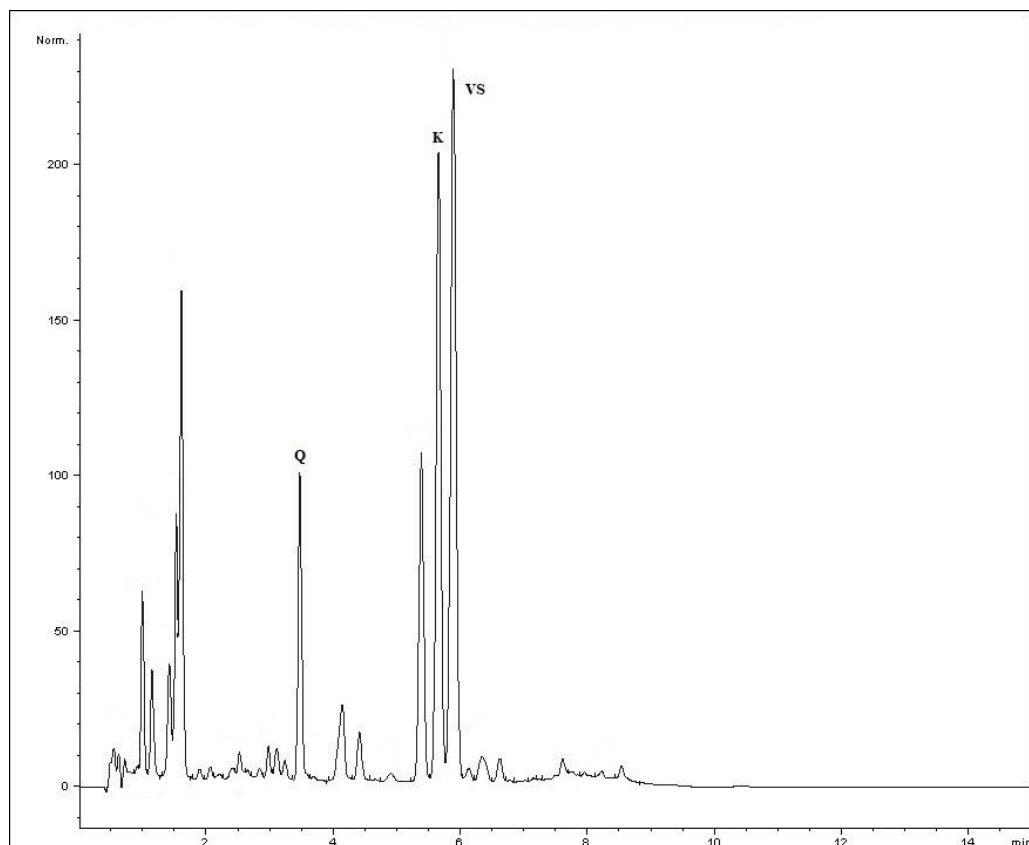
V jarním osevu *Namenie* bylo nalezeno největší množství kemferolu, $1020 \pm 39,7$ mg/kg sušiny a kvercetinů 650 ± 29 mg/kg sušiny. Analýza podzimního osevu *Namenie* prokázala velmi vysoký obsah kvercetinů $1360 \pm 8,01$ mg/kg sušiny, a také kemferolu, jehož množství bylo $993 \pm 5,07$ mg/kg sušiny.

Literární zdroje zabývající se studiem této listové zeleniny nejsou známy. Naměřené koncentrace by se daly srovnat s roketou setou (*Eruca sativa*), známou také pod názvem rukola setá, kterou podrobil výzkumu BELL L. *et al.*, (2015). Ve své práci zkoumal celkem 28 různých odrůd rukoly (25 *E. sativa* a 3 *E. vesicaria*). Vzorky byly pěstovány v režimu dlouhého dne po dobu 30ti dní a následně podrobeny analýze pomocí LC-MS (Liquid Chromatography Mass Spectrometry). Celkový obsah

flavonolů byl stanoven v rozmezí 500-3800 mg/kg sušiny. Mezi stanovenými flavonoly byl nejvíce zastoupen kemferol, konkrétně kemferol-3,4'-diglukosid, který byl detekován ve všech zkoumaných vzorcích a jehož koncentrace byla 300-1100 mg/kg sušiny a kemferol-3-glukosid s koncentrací v rozmezí 100-800 mg/kg sušiny. Nejvyšší obsah kvercetinu byl stanoven na 600 mg/kg sušiny. Tato hodnota je srovnatelná s kvercetinem v prvním osevu. Nicméně ve druhém osevu byl mnou zjištěný obsah kvercetinu více než dvojnásobný. PASSINI F. *et al*, (2012) analyzoval 32 odrůd rukoly, které vypěstoval v polních podmínkách na jaře roku 2008. Zjistil, že kemferol-3,4'-diglukosid je rovněž nejobsáhlejším flavonolem, a to o obsahu 8070-23680 mg/kg sušiny, 8-23krát více než mnou zjištěné výsledky z obou osevů.



Obrázek 40. Záznam analýzy jarního osevu Namenie



Obrázek 41. Záznam analýzy podzimního osevu Namenie

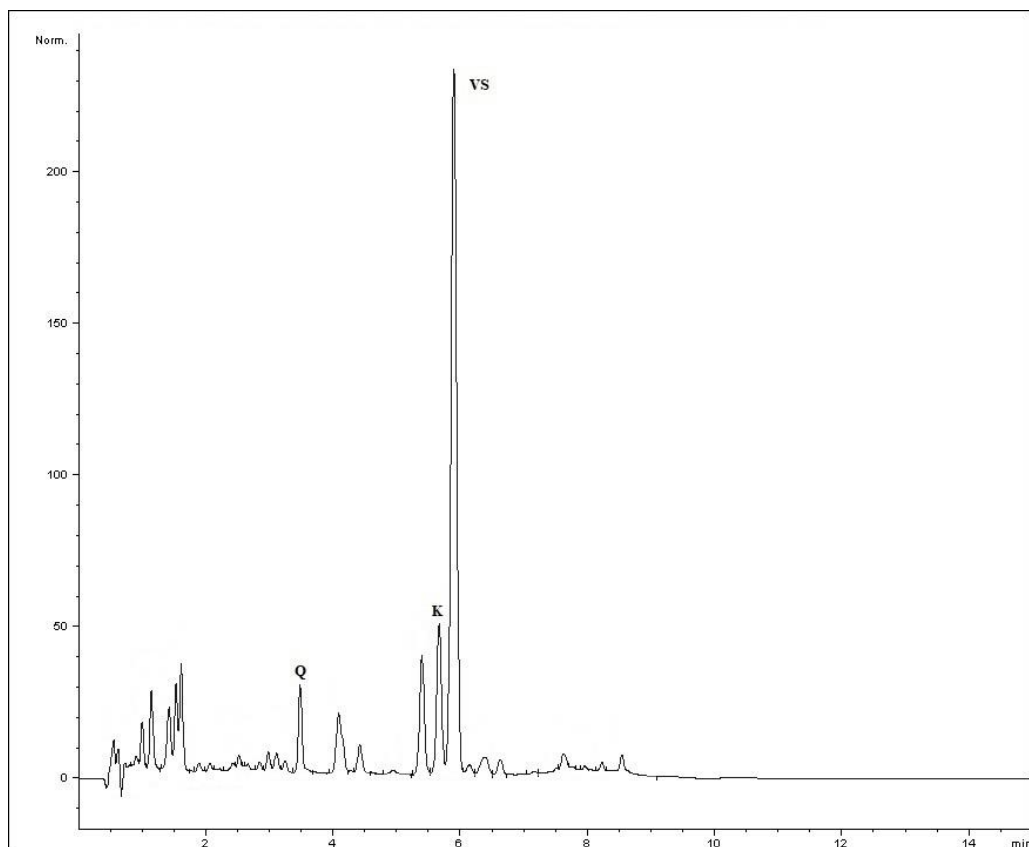
2. Pak Choi/Brukev čínská (*Brassica rapa ssp. chinensis*)

– odrůda Sagami

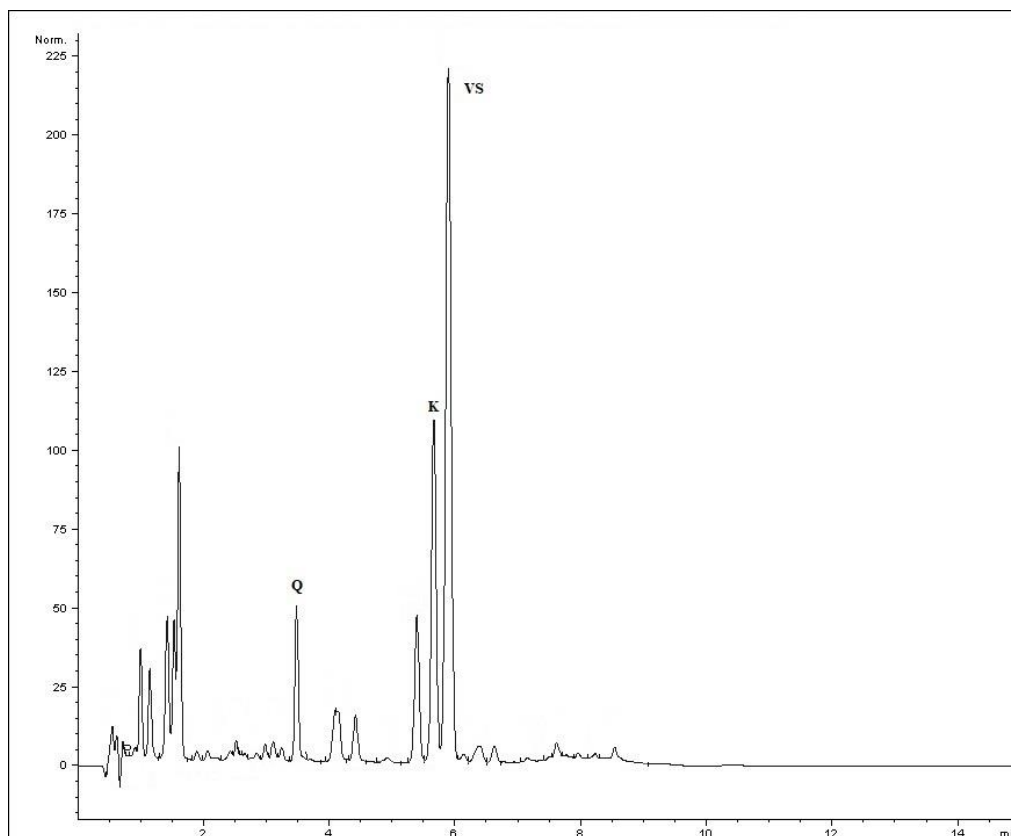
Ze záznamu Sagami vyplývá, že v prvním osevu nebyly zjištěny příliš vysoké koncentrace vybraných aglykonů. Nejvyšší obsah byl zaznamenán u kvercetinu, přesněji $378 \pm 7,92$ mg/kg sušiny, a dále u kemferolu, kde byl celkový obsah $348 \pm 3,94$ mg/kg sušiny. Chromatografický profil druhého osevu odrůdy Sagami ukázal poměrně významné množství kvercetinu, a to $707 \pm 11,7$ mg/kg sušiny. Dalším stanoveným aglykonem byl kemferol s obsahem $451 \pm 6,68$ mg/kg sušiny.

Studii, zabývajících se brukví čínskou je velké množství, ovšem výzkumy této odrůdy nejsou známy. Sagami je možné porovnat s výzkumem Pak Choi, který prováděl KYRIACOU M. C. *et al.*, (2019) a zjistil obsah celkového kvercetinu 647 mg/kg sušiny. Tato hodnota zmíněného aglykonu se blíží obsahu naměřenému v podzimním osevu. Co se kemferolu týče, obsah byl stanoven 224 mg/kg sušiny, tedy méně, než vykazovaly oba mnou zkoumané osevy. Pokud bychom srovnávali koncentrace sledovaných flavonoidů v přepočtu na čerstvou hmotu, nejbližší kemferolu by byla Pak Choi, kterou mimo jiné analyzoval CAO J. *et al.*, (2010). Obsah

stanovil na 40 mg/kg čerstvé hmoty, zatímco podzimní osev Sagami je roven 48 mg/kg čerstvé hmoty. Obsah kvercetinu z jarního osevu 32 mg/kg čerstvé hmoty je totožný s obsahem v ledovém salátu, zatímco druhý osev prokázal 75 mg/kg čerstvé hmoty. Tato hodnota by se dala srovnat s Mizunou (70 mg/kg čerstvé hmoty), kterou podrobil analýze KHANAM U. K S. *et al*, (2012).



Obrázek 42. Záznam analýzy jarního osevu Sagami



Obrázek 43. Záznam analýzy podzimního osevu Sagami

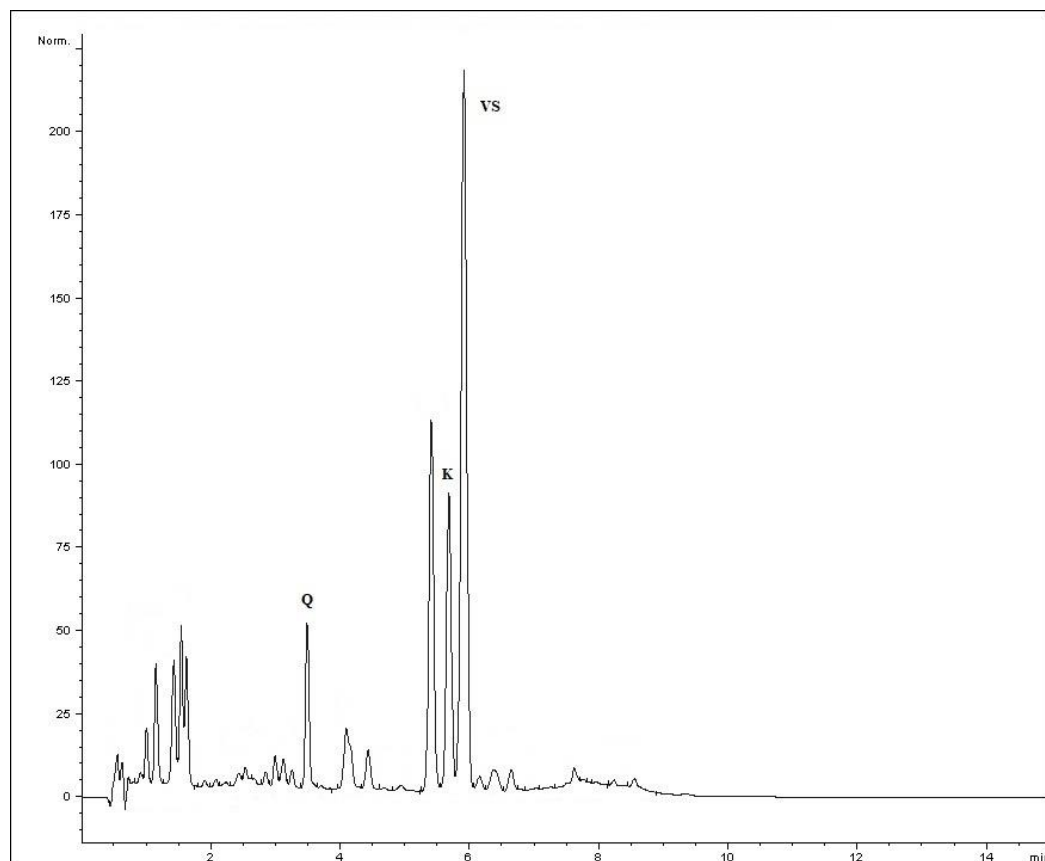
3. Pak Choi/Brukev čínská (*Brassica rapa ssp. chinensis*)

– odrůda Golden Lion

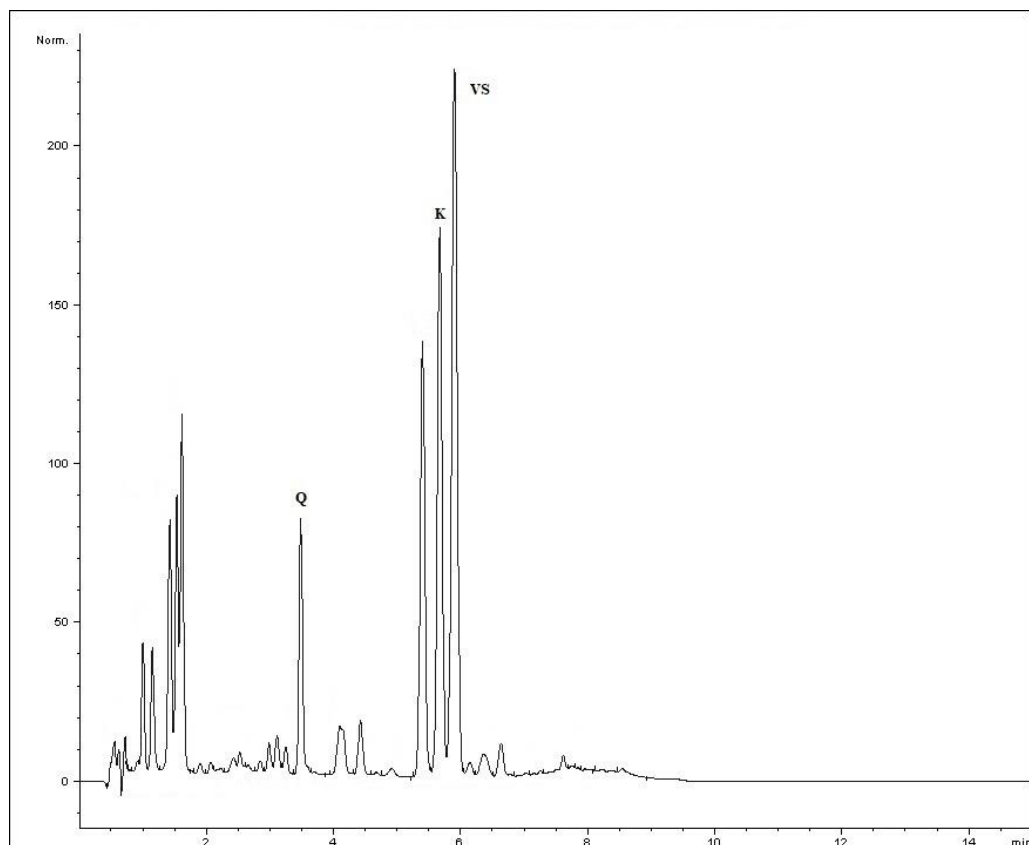
Golden Lion v prvním osevu vykazoval vysoký obsah kemferolu, $1110 \pm 11,5$ mg/kg sušiny. Rovněž množství kvercetinu dosahovalo relativně vysoké hodnoty $728 \pm 5,19$ mg/kg sušiny. Bylo zjištěno, že ve druhém osevu Golden Lion se vyskytovaly značně vysoké obsahy sledovaných aglykonů, a to konkrétně kvercetinu, jehož množství dosahovalo $1130 \pm 5,39$ mg/kg sušiny a kemferolu, u něhož byl stanoven obsah $1300 \pm 16,5$ mg/kg sušiny.

SEONG G. U. *et al.*, (2016) zkoumal obsah polyfenolů v listech brukve čínské, které rozdělil do tří sekcí: vnější, střední a vnitřní. Byly stanoveny celkem čtyři fenolické kyseliny (kávová, ferulová, *p*-kumarová a sinapová) a jeden flavonoid myricetin. Celkový obsah flavonoidů se vyskytoval v rozpětí 613-3282 mg/kg sušiny, přičemž nejvyšší koncentrace byla ve vnějších listech. KYRIACOU M. C. *et al.*, (2019) stanovil obsah celkového kvercetinu 1140 mg/kg sušiny, toto množství by se dalo srovnat s množstvím v podzimním osevu. Obsah kvercetinu v jarním osevu přepočtený na čerstvou hmotu je možné srovnat s výzkumem odrůdy Mibuna, který

provedl KHANAM U. K. S. *et al*, (2012). Analýza prokázala obsah aglykonu 47 mg/kg čerstvé hmoty, rovněž u Golden Lion byla zjištěna totožná hodnota. Obsah kemferolu 72-101 mg/kg čerstvé hmoty lze porovnat se stanovením téhož flavonolu v Komatsuně, které provedl YANG R. Y. *et al*, (2008), jejíž obsah byl 97 mg/kg čerstvé hmoty.



Obrázek 44. Záznam analýzy jarního osevu Golden Lion

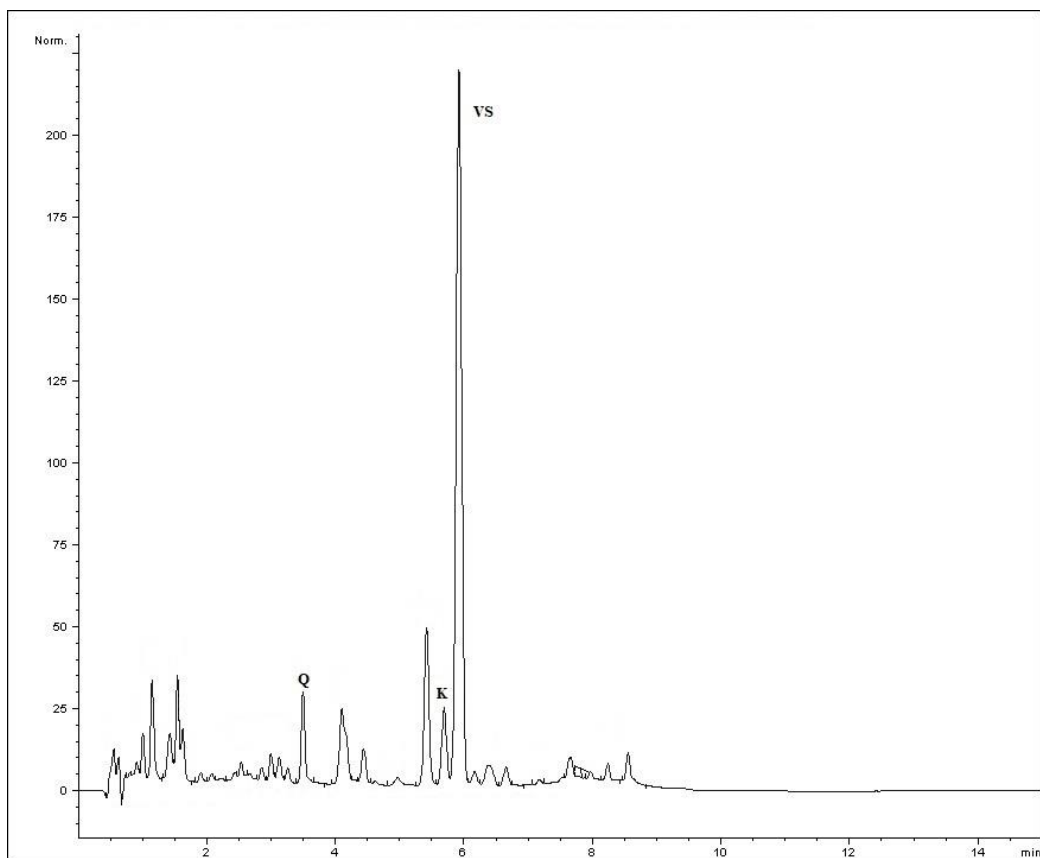


Obrázek 45. Záznam analýzy podzimního osevu Golden Lion

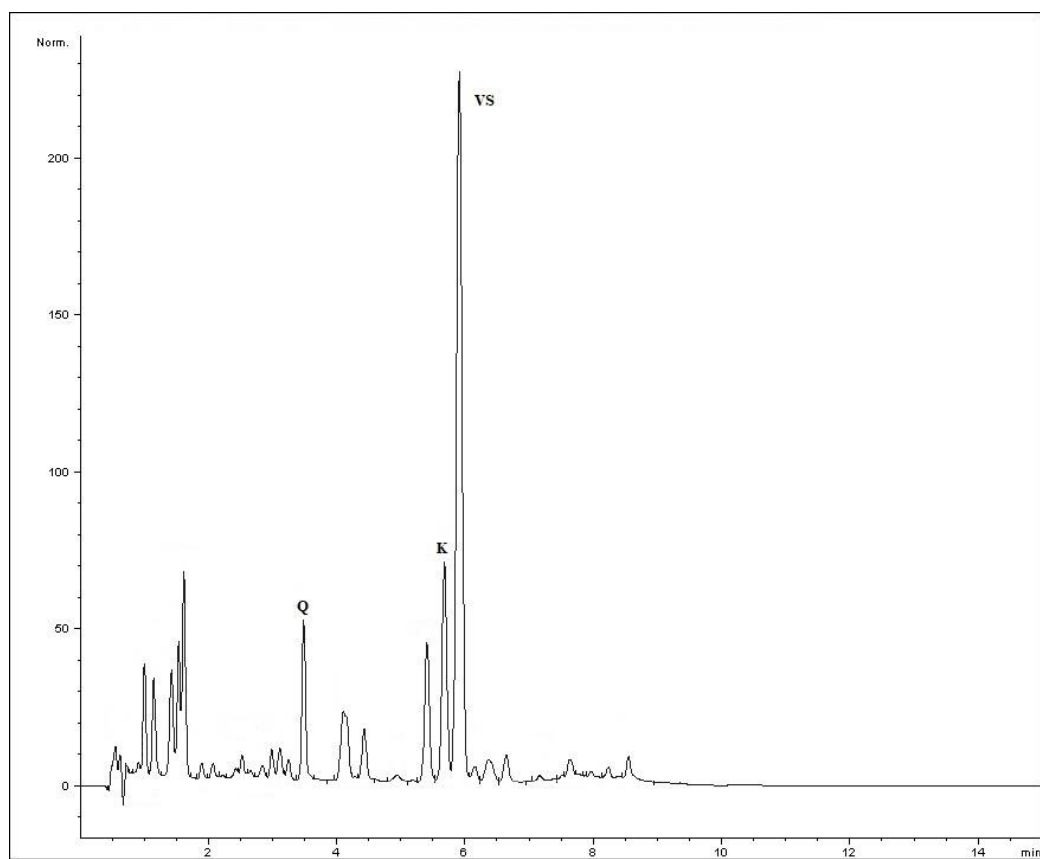
4. Tatsoi (*Brassica rapa ssp. rosularis*)

Jarní osev odrůdy Tatsoi při analýze neprokázal vysoký obsah žádného ze sledovaných aglykonů. Kvercetin se zde vyskytoval v množství $387 \pm 22,5$ mg/kg sušiny, obsah kemferolu byl stanoven na $443 \pm 18,9$ mg/kg sušiny. Podzimní osev Tatsoi obsahoval $704 \pm 8,7$ mg/kg sušiny kvercetinu a $418 \pm 4,87$ mg/kg sušiny kemferolu.

Výzkumy se touto odrůdou začaly zabývat poměrně nedávno. KYRIACOU M. C. *et al*, (2019) zkoumal několik asijských zelenin, včetně Tatsoi. Ta byla pěstována po dobu 16ti dní v růstové komoře pod LED osvětlením a o průměrné teplotě 20 °C. Vzorky podrobil metodě UHPLC (*Ultra High Performance Liquid Chromatography*) a stanovil obsah celkového kvercetinu na 654 mg/kg sušiny, což by se dalo přirovnat k mým výsledkům z podzimního osevu. Na druhou stranu, obsah kemferolu 1861 mg/kg sušiny je oproti mým výsledkům z obou osevů čtyřnásobný. Analýzu této zeleniny, rovněž pěstovanou v růstové komoře, ovšem po dobu 12ti dní provedl také PANNICO A. *et al*, (2020), který stanovil celkový obsah flavonoidů na 594 mg/kg sušiny.



Obrázek 46. Záznam analýzy jarního osevu Tatsoi



Obrázek 47. Záznam analýzy podzimního osevu Tatsoi

VI. Závěr

Literární přehled, zpracovaný pomocí odborné literatury v první kapitole shrnuje základní charakteristiku rostlin z čeledi brukvovitých, dále představuje vybrané odrůdy netradiční asijské listové zeleniny a také jejich pěstování. Značná část této práce je věnována kapitole druhé, která popisuje polyfenolické sloučeniny, především jejich nejpočetnější skupinu, zvanou flavonoidy. V poslední kapitole literární části byla pozornost věnována také vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC), jakožto nejvhodnější analytické metodě.

K analýze byly vybrány celkem čtyři druhy asijské listové zeleniny, Namenia, Pak Choi (Sagami, Golden Lion) a Tatsoi, vypěstované v místních podmínkách na školním pozemku Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích na jaře a na podzim roku 2018. Po sklizni byly vzorky usušeny, namlety a lyofilizovány.

V praktické části této bakalářské práce byl metodou HPLC zkoumán obsah flavonolů (kemferolu, kvercetinu, morinu, myricetinu) a flavonů (apigeninu, luteolinu) v již zmíněných vzorcích zeleniny, nicméně detekovány byly pouze první dva zmíněné aglykony.

Celkově se vyšší koncentrace sledovaných aglykonů vyskytovaly v podzimních osevech. Nejvyšší množství celkového kvercetinu $1360 \pm 8,01$ mg/kg sušiny bylo zjištěno u odrůdy Namenia, zatímco obsah celkového kemferolu byl nalezen v brukvi čínské, konkrétně v odrůdě Golden Lion, kde byl naměřen obsah $1130 \pm 5,39$ mg/kg sušiny. Po přepočtu na čerstvou hmotu byl nejvyšší obsah obou aglykonů zjištěn u podzimního osevu Namenie, a to 157 mg/kg kvercetinu a 114 mg/kg kemferolu.

Oproti tomu nejnižší naměřené obsahy se vyskytovaly u jarního osevu odrůdy Sagami. Množství celkového kvercetinu bylo 378 mg/kg sušiny, množství celkového kemferolu 348 mg/kg sušiny. Nicméně po přepočtu na čerstvou hmotu byla nejnižší koncentrace kvercetinu zjištěna u jarního osevu Tatsoi, pouhých 30 mg/kg čerstvé hmoty. Nejnižší obsah kemferolu 29 mg/kg čerstvé hmoty byl naměřen u jarního osevu Sagami.

VII. Použitá literatura

- AGATI G., AZZARELLO E., POLLASTRI S., TATTINI M., (2012): Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science*, 196: 67-76.
- AL-SHEHBAZ I. A., (2012): Neotropical Brassicaceae. Dostupné online: <http://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Brassicaceae.htm>, staženo dne 24. 3. 2020.
- ANJUM N. A., AHMAD I., PEREIRA M. E., DUARTE A. C., UMAR S., KHAN N. A., EDS., (2012): The Plant Family Brassicaceae, Contribution Towards Phytoremediation. Springer Science. 342 s.
- BELL L., ORUNA-CONCHA M. J., WAGSTAFF C., (2015): Identification and quantification of glucosinolate and flavonol compounds in rocket salad (*Eruca sativa*, *Eruca vesicaria* and *Diplotaxis tenuifolia*) by LC-MS: Highlighting the potential for improving nutritional value of rocket crops. *Food Chemistry*, 172: 852-861.
- CAO J., CHEN W., ZHANG Y., ZHANG Y., ZHAO X., (2010): Content of Selected Flavonoids in 100 Edible Vegetables and Fruits. *Food Science*, 16 (5): 395-402.
- CREASY R., (1999): The Edible Salad Garden. Periplus Editions. 106 s.
- DADÁKOVÁ E., KALINOVÁ J., (2010): Determination of quercetin glycosides and free quercetin in buckwheat by capillary micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Separation Science*, 33: 1633-1638.
- DADÁKOVÁ E., PROCHÁZKOVÁ E., KŘÍŽEK M., (2001): Application of micellar electrokinetic capillary chromatography for quantitative analysis of quercetin in plant materials. *Electrophoresis*, 22: 1573-1578.
- DAKORA F. D., PHILLIPS D. A., (1996): Diverse functions of isoflavonoids in legumes transcend antimicrobial definitions of phytoalexins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 4: 1-20.
- DEVI K. P., MALAR D. S., NABAVI S. F., SUREDA A., XIAO J., NABAVI S. M., DAGLIA M., (2015): Kaempferol and inflammation: From Chemistry to medicine. *Pharmacological Research*, 99: 1-10.

ERLUND I., (2004): Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*, 24 (10): 851-874.

FORMICA J., V., REGELSON W., (1995): Review of the Biology of Quercetin and Related Bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology*, 33 (12): 1061-1080.

HIGDON J. V., FREI B., (2003): Tea Catechins and Polyphenols: Health Effects, Metabolism, and Antioxidant Functions. *Food Science and Nutrition*, 43 (1): 89-143.

CHOI Y. J., KIM J. Y., PARK J. H., SHIN H. D., (2012): First Report of Tatsoi Downy Mildew Caused by *Hyaloperonospora brassicae* in Korea. *Plant Disease*, 96 (11): 1703.

CHURÁČEK J., (1997): Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod. Praha. Nakladatelství technické literatury. 384 s.

KARAKAYA S., NEHIR EL S., (1999): Quercetin, luteolin and kaempferol contents of some foods. *Food Chemistry*, 66: 289-292.

KHANAM U., K., S., OBA S., YANASE E., MURAKAMI Y., (2012): Phenolic acids, flavonoids and total antioxidant capacity of Selected leafy vegetables. *Journal of Functional Foods*, 4: 979-987.

KLOUDA P., (2003): Moderní analytické metody. Ostrava. Pavel Klouda. 132 s.

KŘÍŽEK M., ŠÍMA J., (2015): Analytická chemie. České Budějovice. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, zemědělská fakulta. s. 186-192.

KYRIACOU M. C., EL-NAKHEL CH., GRAZIANI G., PANNICO A., SOTERIOU G. A., GIORDANO M., RITIENI A., DE PASCALE S., ROUPHAEL Y., (2019): Functional quality in novel food sources: Genotypic variation in the nutritive and phytochemical composition of thirteen microgreens species. *Food Chemistry* 277: 107-118.

MANACH C., DONOVAN J. L., (2004): Pharmacokinetics and Metabolism of Dietary Flavonoids in Humans. *Free Radical Research*, 38 (8): 771-785.

OLLIS W. D., (1966): The neoflavonoids, a new class of natural products. *Experimentia*, 22: 777-783.

- ORTEGA-GARCIA J. G., MONTES-BELMONT R., RODRIGUEZ-MONROY M., RAMIREZ-TRUJILLO J. A., SUAREZ-RODRIGUEZ R., SEPULVEDA-JIMENEZ G., (2015): Effect of *Trichoderma asperellum* applications and mineral fertilization on growth promotion and the content of phenolic compounds and flavonoids in onions. *Scientia Horticulturae*, 195: 8-16.
- OSOSKI A. L., KENNELLY E. J., (2003): Phytoestrogens: a Review of Present State of research. *Phytotherapy Research*, 17: 845-869.
- PANNICO A., EL-NAKHEL CH., GRAZIANI G., KYRIACOU M. C., GIORDANO M., SOTERIOU G., ZARRELLI A., RITIENI A., DE PASCALE S., ROUPHAEL Y., (2020): Selenium Biofortification Impacts the Nutritive Value, Polyphenolic Content, and Bioactive Constitution of Variable Microgreens Genotypes. *Antioxidants* 9 (272): 21 s.
- PATEL D., SHUKLA S., GUPTA S., (2007): Apigenin cancer chemoprevention: Progress, potential and promise (Review). *International Journal of Oncology*, 30: 233-245.
- REYNAUD J., GUILLET D., TERREUX R., LUSSIGNOL M., WALCHSHOFER N., (2005): Isoflavonoids in nonleguminous families: an update. *Natural Product Reports*, 22: 504-515.
- SEONG G.-U., HWANG I.-W., CHUNG S.-K., (2016): Antioxidant capacities and polyphenolics of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *Pekinensis*) leaves. *Food Chemistry*, 199: 613-618.
- SEMWAL D. K., SEMWAL R. B., COMBRINCK S., VILJOEN A., (2016): Myricetin: A Dietary Molecule with Diverse Biological Activities. *Nutrients*, 8 (2): 90.
- SHUKLA S., GUPTA S., (2010): Apigenin: A promising molecule for cancer prevention. *Pharmaceutical Research*, 27: 962-978.
- SMITH N., MORI S. A., HENDERSON A., STEVENSON D., (2004): Flowering Plants of the Neotropics. Princeton University Press. 616 s.
- STACE C. A., (1997): New Flora of the British Isles. Cambridge University Press. 1165 s.

ŠETLÍK I., SEIDLOVÁ F., ŠANTRŮČEK J., (2004): Fyziologie rostlin. Dostupné online: <https://web.natur.cuni.cz/biochem/kucera/rostliny/is/fyzros.html>, staženo dne 26. 3. 2020.

ŠTULÍK K., (2004): Analytické separační metody. Praha. Karolinum. 264 s.

TANG J., WANG F., HUANG Z., XIONG A., HOU X., (2013): Characterization and co-expression analysis of WRKY orthologs involved in responses to multiple abiotic stresses in Pak-choi (*Brassica campestris* ssp. *chinensis*). *BMC Plant Biology*, 13 (188): 1471-2229.

VALÍČEK P. a kol. (2002): Užité rostliny tropů a subtropů. Praha. Academia. 486 s.

VEITCH N. C., (2007): Isoflavonoids of the Leguminosae. *Natural Product Reports*, 24: 417-464.

VELÍŠEK J., HAJŠLOVÁ J., (2009): Chemie potravin II. Tábor. OSSIS. 644 s.

VOLKA K., (1995): Analytická chemie II. Praha. Nakladatelství technické literatury. 236 s.

WELCH C. R., WU Q., SIMON J. E., (2008): Recent Advances in Anthocyanin Analysis and Characterization. *Current Analytical Chemistry*, 4: 75-101.

YANG R. Y., LIN S., KUO G., (2008): Content and distribution of flavonoids among 91 edible plant species. *Journal Clinical Nutrition*, 17: 275-279.

<https://tamarorganics.co.uk/product/namenia>, staženo dne 23. 3. 2020.

<https://tamarorganics.co.uk/product/pak-choi>, staženo dne 23. 3. 2020.

<https://abecedazahrady.dama.cz/clanek/cinske-zeli-z-ceske-zahradky-vypestujte-si-ho>, staženo dne 26. 3. 2020.

<https://www.ireceptar.cz/zahrada/vysejte-si-zeli-na-salat-cinske-vyroste-za-mesic-pekinske-za-dva.html>, staženo dne 26. 3. 2020.

<https://www.celostnimedicina.cz/kvercetin.htm>, staženo dne 22. 3. 2020.

<https://www.phytochemicals.info/phytochemicals/kaempferol.php>, staženo dne 22. 3. 2020