

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Analýza významných biologicky aktivních látek v různých částech
ličořeřišnice větší s využitím HPLC/MS/MS

Bc. Tereza Šalomounová

Diplomová práce

2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Tereza Šalomounová**
Osobní číslo: **C17523**
Studijní program: **N1407 Chemie**
Studijní obor: **Analytická chemie**
Název tématu: **Analýza významných biologicky aktivních látek v různých částech lichořeřišnice větší s využitím HPLC/MS/MS**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracujte literární rešerši se zaměřením na způsoby extrakce významných biologicky aktivních látek obsažených v lichořeřišnici větší a jejich analýzu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie a spojení s hmotnostní spektrometrií. Především se zabývejte fenolickými látkami a glukosinoláty. Dále se věnujte metodám stanovení antioxidační kapacity přírodních antioxidantů, se zaměřením na látky obsažené v lichořeřišnici.
2. Na základě literární rešerše zvolte vhodné spektrofotometrické metody pro určení celkového obsahu látek s antioxidačními vlastnostmi. Metody použijte pro stanovení antioxidačních vlastností extraktů z různých částí lichořeřišnice. Výsledky porovnejte a kriticky zhodnoťte.
3. Pomocí HPLC/MS identifikujte významné fenolické látky obsažené v lichořeřišnici a proveďte optimalizaci chromatografické separace a hmotnostně spektrometrické detekce s využitím MRM přechodů pro stanovení významných fenolických látek společně s glukotropaeolinem. Optimalizovanou HPLC/MS/MS metodu využijte pro analýzu významných biologicky aktivních látek obsažených ve vzorcích lichořeřišnice.
4. Porovnejte a diskutujte obsah a zastoupení biologicky aktivních látek v jednotlivých částech lichořeřišnice. Výsledky porovnejte a zhodnoťte.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucí práce.

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.

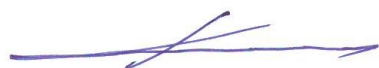
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce:

5. února 2019

Termín odevzdání diplomové práce:

9. května 2019



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2019

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 10. 5. 2019

Tereza Šalomounová

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat doc. Ing. Lence Česlové, Ph.D. za odborné rady, pomoc při řešení problémů, za čas strávený s vypracováním diplomové práce a ochotu při konzultacích.

ANOTACE

Tato diplomová práce se zabývá identifikací a kvantifikací fenolických látek a glukotropaeolinu v různých částech lichořeřišnice větší pomocí HPLC/MS/MS. Nejprve byla provedena optimalizace chromatografické separace a hmotnostně spektrometrické detekce sledovaných látek. Optimalizovaná metoda byla poté použita pro analýzu methanolických extraktů připravených z různých částí rostliny. Dále byl sledován vliv sušení či mražení na obsah monitorovaných látek a vliv okyselení na účinnost extrakce. V neposlední řadě byla měřena antioxidační aktivita, celkové množství fenolických látek a anthokyaninů v extraktech pomocí spektrofotometrických technik.

KLÍČOVÁ SLOVA

Lichořeřišnice, fenolické látky, glukosinoláty, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, antioxidační aktivita

TITLE

Analysis of significant bioactive substances in various parts of the nasturtium using HPLC/MS/MS

ANNOTATION

The goal of this thesis is the identification and quantification of phenolic compounds and glucotropaeolin in various parts of the nasturtium using HPLC/MS/MS technique. First, the optimization of chromatographic separation and mass spectrometric detection of monitored compounds was performed. The optimized method was used to analyse methanolic extracts prepared from different parts of the plant. Further, the effect of drying or freezing on the content of monitored compounds and the effect of acidification on the extraction efficiency was monitored. Last but not least, the antioxidant activity, total amount of phenolic compounds and anthocyanins were measured using spectrophotometric techniques.

KEYWORDS

Nasturtium, phenolic compounds, glucosinolates, liquid chromatography, mass spectrometry, antioxidant activity

Obsah

1	TEORETICKÁ ČÁST	14
1.1	Lichořeřišnice větší.....	14
1.2	Chemické složení.....	15
1.2.1	Flavonoidy	15
1.2.2	Hydroxyskořicové kyseliny	18
1.2.3	Glukosinoláty.....	18
1.2.4	Mastné kyseliny	20
1.2.5	Karotenoidy	21
1.2.6	Kyselina askorbová.....	22
1.3	Účinky na zdraví.....	23
1.3.1	Diuretický účinek.....	23
1.3.2	Kardiorenální účinek.....	24
1.3.3	Antimikrobiální účinek	24
1.3.4	Další účinky	25
1.4	Sklizení	25
1.5	Technologie po sklizni.....	26
1.6	Antioxidační kapacita	26
1.6.1	Metody měření antioxidační kapacity.....	27
1.6.2	Antioxidační účinek, stanovení antioxidační kapacity a celkového množství fenolických látek	28
1.7	Úprava vzorku	29
1.7.1	Extrakce kapalina-kapalina.....	29
1.7.2	Extrakce ultrazvukem	29
1.7.3	Soxhletova extrakce	30
1.7.4	Lyofilizace	30
1.7.5	Macerování	30
1.8	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	30
1.8.1	Instrumentace.....	31
1.9	Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií	33
1.9.1	Ionizace elektrosprejem	33
1.9.2	Kvadrupólový analyzátor.....	34
1.10	Stanovení fenolických látek v lichořeřišnici větší pomocí chromatografických metod	35
1.11	Stanovení glukosinolátů v lichořeřišnici větší pomocí chromatografických metod...	36

2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	37
2.1	Přístroje a zařízení	37
2.2	Použité chemikálie.....	37
2.2.1	Chemikálie	37
2.2.2	Standardy	38
2.2.3	Vzorky	39
2.3	PRACOVNÍ POSTUPY	40
2.3.1	Příprava a extrakce vzorků	40
2.3.2	Spektrofotometrické metody.....	40
2.3.3	HPLC/MS analýza	42
3	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	43
3.1	Stanovení antioxidační aktivity	43
3.2	Stanovení celkového množství fenolických látek	46
3.3	Stanovení celkového množství anthokyaninů pH diferenciální metodou	48
3.4	Identifikace a kvantifikace fenolických látek a glukosinolátů ve vzorcích ličořeřišnice větší	51
3.4.1	Optimalizace HPLC/MS	51
3.4.2	Kvantifikace fenolických látek a glukosinolátů.....	61
4	Seznam literatury:.....	66
5	PŘÍLOHY	74

Seznam obrázků

Obrázek 1: Lichořeřišnice větší (<i>Tropaeolum majus</i>)	14
Obrázek 2: Základní struktura flavanoidu	15
Obrázek 3: Struktura kvercetinu, kaempferolu a myricetinu	16
Obrázek 4: Obecná struktura anthokyaninu	17
Obrázek 5: Struktura odvozených kyselin.....	18
Obrázek 6: Obecná struktura glukosinolátů (vlevo) a struktura glukotropaeolinu (vpravo)...	19
Obrázek 7: Struktura kyseliny olejové	20
Obrázek 8: Struktura kyseliny erukové	20
Obrázek 9: Struktura kyseliny linolové	20
Obrázek 10: Struktura β -karotenu	21
Obrázek 11: Struktura luteinu	21
Obrázek 12: Struktura kyseliny askorbové.....	22
Obrázek 13: Základní schéma HPLC	32
Obrázek 14: Základní schéma HPLC/MS	33
Obrázek 15: Schéma kvadrupólového analyzátoru	34
Obrázek 16: Závislost úbytku A na množství přidávaného vzorku	43
Obrázek 17: Úbytek absorbance v závislosti na čase	44
Obrázek 18: Kalibrační křivka závislosti úbytku A na koncentraci Troloxu.....	44
Obrázek 19: Antioxidační aktivita vzorků lichořeřišnice větší	46
Obrázek 20: Kalibrační závislost změny A na koncentraci kyseliny gallové	47
Obrázek 21: Celkové množství fenolických látek vzorků lichořeřišnice větší	48
Obrázek 22: Závislost nárůstu absorbance na množství přidávaného vzorku.....	49
Obrázek 23: Spektrální charakteristika anthokyaninu v pH 1 a pH 4,5 ve vzorku červených květů.....	49
Obrázek 24: Spektrální charakteristika anthokyaninu v pH 1 a pH 4,5 ve vzorku žlutých květů.....	50
Obrázek 25: Celkový obsah anthokyaninů ve vzorcích lichořeřišnice větší	50
Obrázek 26: Separace látek na koloně Kinetex Polar C18 (150 × 3 mm, 2,6 μ m), mobilní fáze: ACN: H ₂ O +HCOOH (0,3 %), gradient: 0 min-10 %, 10 min-40 %, průtok: 0,5 ml/min, teplota kolony: 30°C, dávkování: 2 μ l, detekce: 280 nm.....	51

Obrázek 27: Separace látek na koloně Kinetex Polar C18 (150 × 3 mm, 2,6 μm), mobilní fáze: ACN/H ₂ O (pH 2,5), gradient: 0 min-10%, 3 min-20%, 5 min-36%, 6 min-50%, 7 min-10%, průtok: 0,5 ml/min, teplota kolony: 30°C, dávkování: 2 μl, detekce: ESI-/SIM	52
Obrázek 28: Separace látek na koloně Kinetex Polar C18 (150 × 3 mm, 2,6 μm), mobilní fáze: ACN/HCOONH ₄ (5mM), gradient: 0 min-10 %, 10 min-40 %, 11 min-70 %, 12 min-10%, průtok: 0,5 ml/min, teplota kolony: 30°C, dávkování: 2μl, detekce: ESI-/SIM	53
Obrázek 29: Optimalizace deklastračního potenciálu pro hmotu 549 (derivát kvercetinu)	54
Obrázek 30: Optimalizace kolizní energie pro hmotu 609 (derivát kaempferolu).....	55
Obrázek 31: Optimalizace CXP pro hmotu 609 (derivát kaempferolu).....	55
Obrázek 32: Optimalizovaná separace látek ve vzorku bobule.....	58
Obrázek 33: Optimalizovaná separace látek ve vzorku listu.....	59
Obrázek 34: Optimalizovaná separace látek ve vzorku stonku.....	59
Obrázek 35: Optimalizovaná separace látek v červených květech	60
Obrázek 36: Optimalizovaná separace látek ve vzorku žlutých květů.....	60

Seznam tabulek

Tabulka 1: Rozdělení flavonoidů	17
Tabulka 2: Koncentrační rozsahy standardů	38
Tabulka 3: Vzorky	39
Tabulka 4: Gradient	42
Tabulka 5: Optimalizované parametry pro MS analýzu.....	56
Tabulka 6: Regresní parametry, meze detekce a meze stanovitelnosti pro jednotlivé látky ...	61
Tabulka 7: Zastoupení jednotlivých látek v sušených vzorcích, koncentrace $\mu\text{g/g}$	62

Seznam použitých zkratek

A	absorbance
AA	antioxidační aktivita
AAPH	2,2'-azobis(2-methylpropionamid) dihydrochlorid
ABTS	2,2'-azinobis(3-ethyl-2, 3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)
ACE	angiotenzin-konvertující enzym
C18	oktadecylsilikagel
CE	kolizní energie
CUPRAC	měření antioxidační kapacity pomocí neocuproinu
CXP	výstupní potenciál kolizní cely
DP	deklasterační potenciál
DPPH	1,1'-difenyl-2-pikrylhydrazyl
FCM	Folin-Ciocalteuho spektrofotometrická metoda
FRAP	měření antioxidační kapacity pomocí železitých iontů
FW	váha čerstvé rostliny
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC/MS	vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem
MRM	monitorování hmotnostních přechodů vybraných iontů
MS	hmotnostní spektrometrie
NP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie v systému s normálními fázemi
ORAC	metoda založená na zhášení kyslíkových radikálů
PET	polyethylentereftalát
PVC	polyvinylchlorid
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie v systému s obrácenými fázemi
TEAC	celková antioxidační aktivita vztažená ke standardní látce – Troloxu
TRAP	antioxidační parametr popisující celkový záchyt radikálu
TPTZ	2,4,6-tripyridyl-S-triazin
TROLOX	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UV	ultrafialová oblast
VIS	viditelná oblast

Úvod

Lichořeřišnice větší je křovinatá rostlina, která je často pěstována pouze pro okrasné účely. Její léčebné účinky jsou však známy již méně. Rostlina je silným přírodním antibiotikem, a díky tomu je velice vhodná k léčbě zánětů různého původu.

Mezi hlavní chemické složky rostliny, které se vyznačují významnou biologickou aktivitou, patří fenolické látky a glukosinoláty. Fenolické látky jsou sekundární metabolity rostlin, jejichž strukturu tvoří flavanové jádro. Fenolické látky jsou charakteristické svými antioxidačními vlastnostmi. Vyznačují se jako donory elektronů, jelikož jsou schopny zachycovat reaktivní formy kyslíku a tím inhibovat nebo zpomalovat oxidační procesy. Antioxidační aktivita fenolických látek je závislá na podmínkách prostředí (pH) a na interakci s ostatními složkami přítomnými ve vzorku. Glukosinoláty jsou také sekundární metabolity rostlin, které ve své struktuře obsahují síru a dusík. Jsou tvořeny sulfátovanou isothiokyanátovou skupinou, která je konjugována s thioglukózou a další R-skupinou a dále postranním řetězcem odvozeným od aminokyseliny. Právě významný antimikrobiální účinek lichořeřišnice větší je spojený s přítomností glukosinolátů a rozkladného produktu benzyliothiokyanátu. Benzyl-isothiokyanát však vzniká pouze za podmínek neutrálního pH.

Fenolické látky a glukosinoláty lze získat extrakcí do vodně-organických rozpouštědel a ke stanovení se zpravidla využívá vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení se spektrofotometrickou detekcí či hmotnostním spektrometrem.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Lichořeřišnice větší

Lichořeřišnice větší, latinským názvem *Tropaeolum majus* L., je trvalá, rychle rostoucí bylina patřící do čeledi *Tropaeolaceae*. Lichořeřišnice roste divoce v horských oblastech Jižní a Střední Ameriky [1-6], konkrétně v Peru a Bolívii [2]. Je to křovinatá rostlina, která obvykle dosahuje délky kolem třiceti centimetrů, vzácně se může rozrůst až na délku devadesáti centimetrů [3, 6]. Květy jsou nejčastěji oranžové, avšak vyskytují se zbarveny i červeně nebo žlutě [5, 6]. Stonek rostliny je měkký, dlouhý a masitý. Listy jsou zelenomodré barvy, zaoblené, dolními částmi fixovány ke středu stonků. Každý plod rostliny obsahuje tři semena, která po spadnutí na zem spontánně klíčí [1]. Lichořeřišnice větší kvete v období od května do listopadu na osvětleném nebo mírně stinném místě [6]. V Evropě se pěstuje od 17. století jako okrasná a léčivá rostlina [2], která se vyznačuje antimikrobiálními, antimykotickými, expektorantními a očistnými vlastnostmi. Používá se při respiračních, oftalmologických a močových infekcích [3] a také v dermatologii pro léčbu onemocnění pokožky, vlasů a nehtů [4]. Může být využita i jako složka potravy, jelikož její listy a květy jsou jedlé a hojně se používají do salátů, kde díky obsahu glukosinolátů dodávají pokrmu pepřový nádech [5]. Zelené lusky rostliny mohou být nakládány a tím použity jako náhrada za kapary [3]. Kvůli vysokému obsahu biologicky aktivních látek je cennou dietní složkou a slouží jako surovina pro výrobu nutraceutik [4]. Vzhledem k přítomnosti anthokyaninů se květy dají využít jako přírodní barvivo v potravinářském a farmaceutickém průmyslu [6].



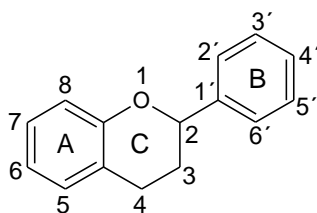
Obrázek 1: Lichořeřišnice větší (*Tropaeolum majus*) [7].

1.2 Chemické složení

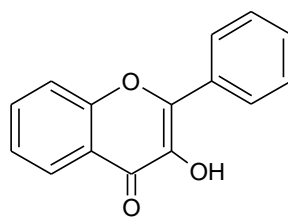
Chemické složení se liší podle zkoumané části rostliny, způsobu a místa pěstování a barvy květů. Lichořeřišnice větší je přirozeným zdrojem makro a mikroprvků. Sto gramů květiny pokrývá 73-100 % doporučené denní dávky zinku, 7 % denní dávky fosforu, 2,5 % denní dávky draslíku, 3 % vápníku, 4 % hořčíku a u mědi se dávka pohybuje v rozmezí 1,2-5,2 % [6]. Mezi hlavní chemické složky patří flavonoidy, glukosinoláty a mastné kyseliny. Rostlina však obsahuje i další významné látky jako jsou karotenoidy, anthokyaniny, terpenoidy, benzylisothiokyanát [8], kyselinu askorbovou a estery kyseliny chinové a kyseliny skořicové [1, 6]. Z mastných kyselin můžeme izolovat kyselinu erukovou, olejovou a linolovou [8]. Mezi hlavní zástupce glukosinolátů patří glukotropaeolin a sinalbin [8]. Z flavonoidů se v rostlině nejvíce vyskytují deriváty kaempferolu a kvercetinu [1, 6, 8]. Obsah flavonoidů je však ovlivněn barvou květů. Největší obsah flavonoidů byl zaznamenán u červených květů, kde byly nejvíce zastoupeny deriváty myricetinu, konkrétně myricetin dihexosid. Nejmenší obsah flavonoidů byl zaznamenán ve žlutých květech, kde největší podíl zaujímají deriváty kaempferolu, konkrétně kaempferol acetyl hexosid [6, 9]. Hlavním anthokyaninem v červených květech je delphinidin, v oranžových květech je to pelargonidin [6]. V květech rostliny se nachází osm karotenoidů, mezi které patří vialxanthin, antheraxanthin, lutein, zeaxanthin, zeinoxanthin, β -kryptoxanthin, α -karoten a β -karoten. Ve žlutě zbarvených květech je obsah luteinu vyšší než v květech zbarvených oranžově [1, 6]. Ze semen rostliny mohou být izolovány esenciální oleje. Takto získaný Lorenzův olej se používá k léčbě adrenoleukodystrofie, což je těžké degenerativní onemocnění [1].

1.2.1 Flavonoidy

Flavonoidy jsou nízkomolekulární látky patřící mezi polyfenolické sloučeniny [10]. Řadí se mezi sekundární metabolity rostlin [11], které jsou produkovány v cytosolu buňky [12]. Základem jejich struktury je flavanové jádro [10], které je složeno ze dvou aromatických cyklů (kruh A a kruh B) spojených heteroatomem (kruh C) [13].



Obrázek 2: Základní struktura flavanoidu [14].



Obrázek 3: Struktura kvercetinu, kaempferolu a myricetinu [14].

pozice OH skupiny: 5, 7, 3', 4' → kvercetin [14]

pozice OH skupiny: 5, 7, 4' → kaempferol [14]

pozice OH skupiny: 5, 7, 3', 4', 5' → myricetin [14]

Flavonoidy jsou syntetizovány z fenylalaninu a malonyl-koenzymu A. Odvozeny jsou od mateřských látek flavonů, které se běžně vyskytují ve šťávě mladých tkání vyšších rostlin. Většina flavonoidů existuje přirozeně jako glykosidy a přítomnost cukrů a hydroxylových skupin je činí rozpustnými ve vodě, zatímco methylové skupiny a isopentylové jednotky způsobují jejich lipofilitu [12]. Biochemická aktivita flavonoidů i jejich metabolitů závisí na chemické struktuře a uspořádání funkčních skupin na molekule. Na základě chemické struktury jsou rozděleny na flavonoly, flavony, flavanony, katechiny, antokyanidiny, isoflavony, dihydroflavonoly a chalkony [10]. Různé třídy flavonoidů se liší úrovní oxidace a strukturou substituce kruhu C, zatímco jednotlivé sloučeniny v rámci třídy se liší ve struktuře substituce kruhů A a B [14]. Flavonoidy mohou být monomerní, dimerní nebo oligomerní. Přirozeně se vyskytují v ovoci, zelenině, oříšcích, semenech, květech, kůře a jsou nedílnou součástí lidské výživy [10]. V rostlinách bylo nalezeno více než pět tisíc druhů flavonoidů [11]. Druhy se liší v závislosti na zralosti a podmínkách růstu rostliny. Rostliny syntetizují širokou škálu flavonoidů jak v kořenech, tak i v tkáních. Flavonoidy jsou látky nezbytné pro život rostlin, jelikož ovlivňují transport rostlinného hormonu auxinu [12]. Chrání rostlinu před houbovými parazity, býložravci, patogeny, oxidačnímu poškození buněk [10] a hrají důležitou roli při interakci s okolním prostředím. Absorbují UV záření, čímž rostlinu chrání před buněčným poškozením [14]. Působí také jako detoxikační činidla, stimulanty klíčení pórů, ovlivňují teplotní aklimatizaci a odolnost rostliny proti suchu. Hrají významnou roli jako signální molekuly v procesu symbiózy rostliny a mikroorganismů [12, 13, 14]. Jsou zodpovědné za barvu rostliny [12, 14] produkcí pigmentů. Například modrá barva listů je důsledek přítomnosti anthokyaninu. Mají také schopnost měnit chemické a enzymatické reakce a tím mít pozitivní nebo negativní vliv na lidské zdraví [11]. Vyznačují se významnou

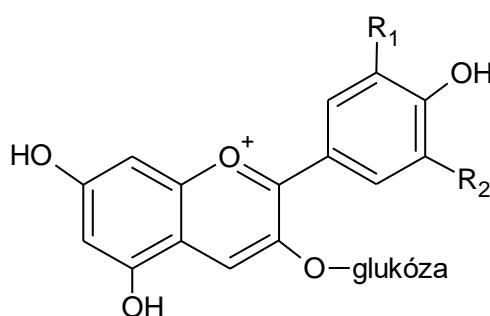
biologickou aktivitou, která se projevuje antibakteriálními, antivirálními, protialergenními a vazodilatačními účinky [10]. Zabraňují také degenerativním onemocněním spojeným s oxidačním stresem [13].

Tabulka 1: Rozdělení flavonoidů [10].

Třída	Příklad konkrétních sloučenin
flavonoly	kaempferol, kvercetin, myricetin
flavony	apigenin, luteolin, vitexin
flavanony	naringin, hesperidin
flavanoly	katechin, gallokatechin
anthokyanidiny	pelargonidin, kyanidin, delphinidin
dihydroxyflavonoly	taxifolin, fustin
isoflavony	daidzein, genistein, glycitein

1.2.1.1 Anthokyaniny

Anthokyaniny jsou nejdůležitější skupinou ve vodě rozpustných rostlinných pigmentů. Jejich struktura vychází ze struktury flavonoidů a vznikají stejnou biochemickou dráhou. V rostlině se vyskytují ve formě glykosidů. Anthokyaniny silně absorbují viditelné světlo, čímž v rostlinných tkáních utvářejí modré, fialové a červené odstíny, přičemž daný odstín a struktura závisí na hodnotě pH [15, 16]. V rostlině se nachází ve vakuolách ve formě vodného roztoku. Jako anthokyanidiny jsou označeny anthokyaniny bez cukerné části [16].

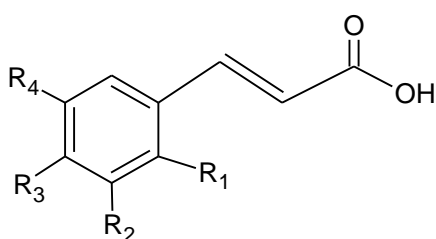


Obrázek 4: Obecná struktura anthokyaninu [15].

Anthokyaniny	R ₁	R ₂
pelargonidin-3-glukosid	H	H
delphinidin-3-glukosid	OH	OH
kyanidin-3-glukosid	OH	H

1.2.2 Hydroxyskořicové kyseliny

Hydroxyskořicové kyseliny jsou fenolické sloučeniny běžně se vyskytující v přírodě. Jsou to sekundární metabolity odvozené od fenylylalaninu a tyrosinu. Tvoří je uhlíkový skelet C₆C₃ s dvojnou vazbou, která může být v konfiguraci *cis* nebo *trans*. Mezi nejznámější deriváty kyseliny skořicové patří kyselina *o*-kumarová, *m*-kumarová, *p*-kumarová, kávová, ferulová a sinapová. Tyto druhy se mohou vyskytovat jako volné karboxylové kyseliny nebo jako estery vytvořené kondenzací s hydroxylovými kyselinami, jako je kyselina chinová, vinná a glykosidy. Nejrozšířenějším rozpustným derivátem je kyselina chlorogenová vzniklá kondenzací kyseliny kávové s kyselinou chinovou [17].

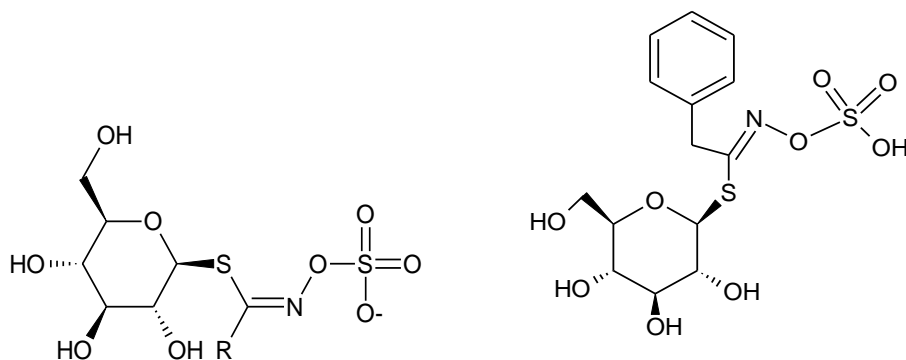


Obrázek 5: Struktura odvozených kyselin [17].

Kyselina	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
<i>o</i> -kumarová	OH	H	H	H
<i>m</i> -kumarová	H	OH	H	H
<i>p</i> -kumarová	H	H	OH	H
kávová	H	OH	OH	H
ferulová	H	OCH ₃	OH	H
sinapová	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
skořicová	H	H	H	H

1.2.3 Glukosinoláty

Glukosinoláty, systematickým názvoslovím β -thioglukosid-N-hydroxysulfáty [18], jsou sekundární metabolity rostlin obsahující síru a dusík [19]. Jejich struktura je tvořena sulfátovanou isothiokyanátovou skupinou, která je konjugována s thioglukózou a další R-skupinou [18], a dále postranním řetězcem odvozeným od aminokyseliny [20]. Glukóza i centrální uhlík isothiokyanátu jsou často dále modifikovány. R-řetězce mohou obsahovat dvojně vazby, oxo, methoxy, hydroxylové, karbonylové nebo disulfidové vazby [18]. Ačkoliv R skupina je hlavním důvodem jejich rozmanitosti, také rozšíření postranního řetězce s následnou oxidací, hydroxylací, methoxylací, sulfonací a glykosilací aminokyselin zapříčiňuje vznik až 132 strukturně odlišných přirozeně se vyskytujících glukosinolátů [19].

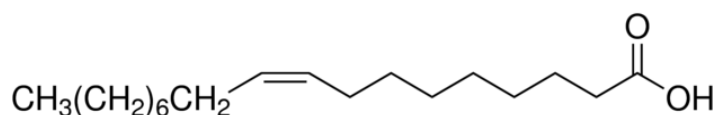


Obrázek 6: Obecná struktura glukosinolátů (vlevo) [18] a struktura glukotropaeolinu (vpravo) [22].

Na základě prekurzorů aminokyselin používaných pro biosyntézu jsou glukosinoláty rozděleny do tří skupin. Prvním typem je alifatický glukosinolát odvozený od alaninu, leucinu, isoleucinu, valinu a methioninu. Druhým typem je benzoový glukosinolát odvozený od fenylalaninu a tyrosinu, a nakonec indolový glukosinolát odvozený od tryptofanu [19]. Každá molekula glukosinolátu tedy obsahuje alespoň dva atomy síry. Jeden atom je součástí sulfátové skupiny pocházející z 3-fosfoadenosin-5-fosfosulfátu, druhý atom síry, pocházející z cysteinu, je částí S-vázaného glukózového zbytku. Glukosinoláty syntetizované z methioninu ve své struktuře obsahují tři atomy síry. Síra je prvek přítomný v proteinech, glutathionu, fytochelatinech, chloroplastových membránových lipidech a je součástí některých koenzymů a vitaminů, proto je to prvek nezbytný pro růst rostliny [21]. Glukosinoláty jsou ve vodě rozpustné sloučeniny uložené ve vakuolách rostlinných tkání. Jejich obsah v rostlině je podmíněn vývojovými stádii a fotoperiodou. Rostliny, obsahující glukosinoláty, produkují enzymy zvané myrozinázy, neboli β -thioglukosidázy, ve specializovaných buňkách zvaných myrozinové buňky. Tyto enzymy jsou zodpovědné za hydrolýzu glukosinolátů, čímž také dochází k produkci několika bioaktivních sloučenin [19]. Pokud dojde k poškození rostlinné tkáně, například působením hub nebo řezáním, glukosinoláty se dostanou do kontaktu s myrozinázou a dojde k uvolnění benzyliothiokyanátu [1]. Glukosinoláty v rostlinách indukují rezistenci vůči patogenům a udržují rovnováhu rostlinného hormonu auxinu. Jejich produkce je obranným mechanismem a signalizačním systémem rostliny k překonání biotických a abiotických stresů z okolního prostředí. Jsou také používány jako přírodní herbicidy, které regulují množství plevelu aniž by znečišťovaly životní prostředí a ohrožovaly lidské zdraví. Vyznačují se také protinádorovými účinky [19].

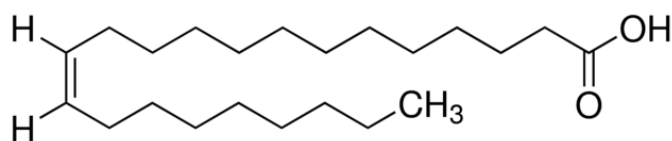
1.2.4 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny jsou strukturní součástí lipidů [23]. Délka řetězce se pohybuje od dvou do více než osmdesáti atomů uhlíku, nejběžněji se ale vyskytují řetězce s dvanácti až dvaadvaceti atomy uhlíku [24]. Mastné kyseliny rozdělujeme na nasycené a nenasycené [23, 24]. Dvojně vazby se ve struktuře vyskytují převážně v cis konfiguraci. S rostoucí délkou řetězce klesá jejich rozpustnost ve vodě. V roztocích o koncentraci vyšší, než je kritická micelární koncentrace, tvoří micely, v nichž je karboxylová skupina orientována do vodné fáze, zatímco alifatická část do nitra micely. Jsou považovány za základní stavební kámen živé hmoty, jelikož se jako součást fosfolipidů podílí na stavbě buněčných membrán a představují hlavní zdroj energie [23]. V lichořeřišnici větší se mastné kyseliny vyskytují v listech a květech [1]. Kyselina olejová, systematickým názvem kyselina cis-oktadek-9-enová, je hlavním zástupcem mononenasycených mastných kyselin. Mezi hlavní zdroje kyseliny olejové patří olivový a řepkový olej, olej z arašídů, z lískových ořechů, avokáda a rýžových otrub [23, 24].



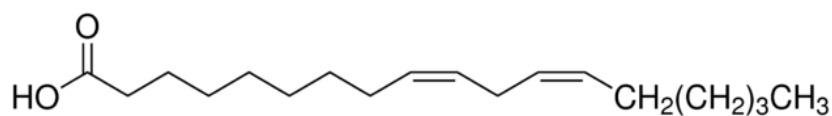
Obrázek 7: Struktura kyseliny olejové [25].

Mezi mononenasycené mastné kyseliny patří rovněž kyselina eruková, systematickým názvem cis-dokos-13-enová. Jejím hlavním zdrojem je řepka olejná. Kyselina eruková má kardiotoxické účinky [23].



Obrázek 8: Struktura kyseliny erukové [26].

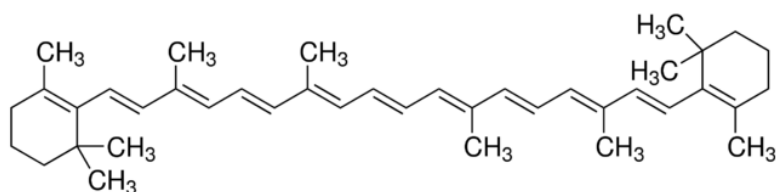
Kyselina linolová, systematickým názvem (cis,cis)-oktadeka-9,12-dienová, je hlavním zástupcem vícenenasycených mastných kyselin, které v molekule obsahují dvě a více dvojných vazeb. Jejimi hlavními zdroji jsou sójový, pupalkový, slunečnicový olej, olej z hroznových semen a máku setého [23, 24].



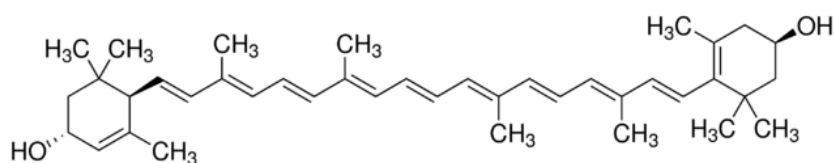
Obrázek 9: Struktura kyseliny linolové [27].

1.2.5 Karotenoidy

Karotenoidy patří mezi nejběžnější přírodní pigmenty [28, 29]. Všechny karotenoidy mají polyisoprenoidní strukturu, dlouhý konjugovaný řetězec obsahující dvojné vazby a téměř oboustrannou symetrii okolo centrální dvojné vazby [28]. Jsou syntetizovány z isoprenu (2-methyl-1,3-butadienu) [30]. Většina karotenoidů může být získána ze čtyřiceti-uhlíkové základní struktury, která zahrnuje systém konjugovaných dvojných vazeb. Centrální řetězec může nést cyklické koncové skupiny, které mohou být substituovány funkčními skupinami obsahujícími kyslík. Na základě struktury jsou karotenoidy rozděleny do dvou skupin, a to na karotenoidy obsahující pouze atomy uhlíku a vodíku a oxokarotenoidy (xanthofyly), nesoucí ve své struktuře alespoň jeden atom kyslíku. Rozdíly ve struktuře jsou důvodem jejich odlišného zbarvení [28]. Podle počtu dvojných vazeb ve struktuře se může molekula vyskytovat v konfiguraci cis nebo trans. V přírodě obecně převládá trans forma. Karotenoidy jsou lipofilní molekuly a mají tendenci se hromadit v lipofilních strukturách, jako jsou lipoproteiny a membrány. V rostlinách přispívají k procesu fotosyntézy a chrání je před světelným poškozením [29]. Jejich konjugovaná polyenová struktura je základem jejich funkce, neboť elektrony ve dvojných vazbách jsou delokalizovány a vyskytují se ve stavu s nižší energií, čímž dochází k absorpci viditelného záření. Působí jako chromofory a jsou důvodem různorodého zbarvení plodů a květin, což slouží k přilákání ptáků a hmyzu. Podílí se na stabilizaci membrán a mohou spojovat elektrony mezi jinými molekulami, jako jsou cytochromy a chlorofyly [30].



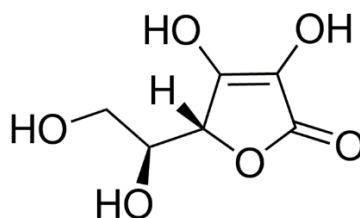
Obrázek 10: Struktura β -karotenu [31].



Obrázek 11: Struktura luteinu [32].

1.2.6 Kyselina askorbová

Kyselina askorbová, neboli vitamin C, je ketolakton se dvěma ionizovatelnými hydroxylovými skupinami. Čistá kyselina askorbová je bílá krystalická látka velmi dobře rozpustná ve vodě za vzniku bezbarvého roztoku. Rostliny a většina zvířat ji syntetizují z glukózy [33].



Obrázek 12: Struktura kyseliny askorbové [34].

Kyselina askorbová je významný metabolit, který hraje důležitou roli ve fyziologii stresu rostlin, v jejich celkovém růstu a vývoji. Jako enzymatický kofaktor se také účastní fotoprotekce a chrání rostlinu před poškozením a hmyzem. V meristematické tkáni rostliny se nachází vysoká koncentrace kyseliny, zatímco v zónách s malým aktivním rozdělením buněk je její koncentrace nízká, což je důkazem, že se účastní také rozšiřování a dělení buněk v rostlině. Kyselina askorbová se vyznačuje významnými antioxidačními vlastnostmi a poskytuje tak ochranu před oxidačním stresem [35, 36, 37]. Reaktivní druhy kyslíku, jako je peroxid vodíku, superoxid a hydroxylový radikál, způsobují oxidační stres a jsou generovány různými faktory v rostlinách. Za normálních podmínek jsou reaktivní druhy kyslíku produkovány během fotosyntézy tvorbou singulárního kyslíku a fotoredukcí kyslíku. Fotooxidační poškození může nastat, pokud jejich produkce převyší antioxidační kapacitu. K tomu může dojít v kombinaci s okolními podmínkami, jako je sucho, extrémní teploty nebo nedostatek živin rostliny. Mezi další faktory, které vedou ke zvýšení produkce reaktivních forem kyslíku, patří ultrafialové záření, přítomnost znečišťujících látek, jako je ozon nebo oxid siřičitý, redoxaktivních herbicidů a fytotoxických kovů, mezi které patří například zinek, měď nebo kadmium. Rostliny je také mohou přímo vyvářet v oxidačních prasklinách, které vznikají během patogenní infekce [36]. Kyselina askorbová je důležitým přenašečem elektronů v rostlině. Funguje jako donor elektronů pro fotosyntézu a mitochondriální transport elektronů. Jelikož se vysoká koncentrace nachází v chloroplastech, hraje důležitou roli v procesu fotosyntézy [38].

1.3 Účinky na zdraví

Vzhledem k bohatému fytochemickému složení se lichořeřišnice v lidové medicíně používá jako léčivá rostlina. Její květy, listy a semena se využívají k přípravě extraktů z ethanolu a vody a k přípravě léčivých sirupů [6]. Vyznačuje se antiseptickými, diuretickými, očistnými a protizánětlivými účinky. Používá se také jako antihypertenzivum a antidepresivum. Slouží k ošetření kůže, očí a pokožky, k léčbě akné a různých druhů ekzémů. Své uplatnění najde i při onemocnění plic a amyotrofické laterální skleróze [1]. Extrakt z rostliny je hlavní složkou léčivého přípravku Angocin® Anti-Infect N, který slouží k léčbě infekce dýchacího ústrojí a močových cest [2].

1.3.1 Diuretický účinek

Známá diuretika, mezi něž patří thiazidy a furosemid, patří k nepoužívanějším lékům na léčbu kardiovaskulárních onemocnění. Tyto léky jsou schopny snížit vysoký krevní tlak doprovázející hypertenzi a zlepšit kardiovaskulární funkci při srdečním selhání. Užívání diuretik je však spojeno i s nežádoucími účinky, jako jsou změny v hladinách systémových elektrolytů, metabolická alkalóza a acidóza a hyperurikemie. Vývoj nových diuretik tedy může jak zlepšit výkon při léčbě kardiovaskulárních onemocnění, tak také snížit výskyt zmíněných nežádoucích účinků [39]. Hlavní složkou listů lichořeřišnice jsou glukosinoláty a flavonoidy, které ovlivňují diuretické účinky [40]. Diuretický účinek byl studován Gasparottem [1] u purifikované frakce získané z hydroethanolického extraktu z listů lichořeřišnice a isokvercitrinu. Po podání jedné dávky extraktu byla diuréza významně zvýšena, celkový objem moči u zvířat byl po 6. hodinách 2,22 ml a po 24. hodinách 3,9 ml. Zvýšení objemu moči je patrné při porovnání s kontrolní skupinou, kde objem moči byl po 6. hodinách 1,02 ml a po 24. hodinách 2,53 ml. Jediné podání isokvercitrinu (10 mg/kg) zvýšilo diurézu na 1,63 ml oproti kontrolní skupině, kde byl objem 0,85 ml [1]. Bylo také prokázáno, že glukotropaeolin, obsažený v rostlině, má antibiotický účinek na infekci močových cest [8]. V lidském těle se převádí na benzyliothiokyanát, který se následně transformuje na deriváty acetylcysteinu. V ledvinách jsou tyto složky vylučovány do moči a velká část z nich je rehydrolyzována na benzyliothiokyanát, což způsobuje zvýšení antimikrobiální aktivity v močovém systému [6]. Na základě studie hydroethanolického extraktu bylo zjištěno, že významný diuretický účinek nastupuje po akutním nebo dlouhodobém perorálním podání. Farmakologický účinek je zprostředkován přímou schopností zvyšovat objem moči a vylučovat sodík bez ovlivnění dalších parametrů souvisejících s funkcí ledvin [8].

1.3.2 Kardiorenální účinek

U ethanolového extraktu lichořeřišnice byla prokázána schopnost zabránit rozvoji renovaskulární hypertenze. Jednou z hlavních příčin oxidačního stresu a renovaskulární hypertenze je renin-angiotenzinový systém, proto jsou léky první volby inhibitory angiotenzin-konvertujícího enzymu (ACE). Ethanolový extrakt lichořeřišnice prokázal prodlouženou ACE inhibiční aktivitu, což mělo za následek snížení arteriálního tlaku a sérového aldosteronu a následně snížení srdeční hypertrofie a zlepšení funkce ledvin [41]. Perorální podání ethanolového extraktu způsobilo po hodině a půl významné snížení arteriálního tlaku u krys [42]. Zvyšuje také průtok krve ledvinami, vyznačuje se vazodilatačním účinkem a zvyšuje hydrostatický tlak v renálních arteriolách, čímž byla následně zvýšena rychlost glomerulární filtrace a tvorby moči. Širokou škálou kardiovaskulárních účinků se vyznačuje hlavní metabolit rostliny, isokvercitrin [41]. Intravenózní podání isokvercitrinu (0,5-4 mg/kg) způsobilo snížení arteriálního tlaku u krys s malými účinky na srdeční frekvenci [42]. Jeho hlavní účinek spočívá v inhibici ACE, zvýšené biologické dostupnosti bradykininu, prostaglandinů a oxidu dusnatého v renálních arteriolách. Účinek získaný z ethanolového extraktu lichořeřišnice však pravděpodobně pochází z komplexních interakcí mezi různými sekundárními metabolity rostliny, které vzájemně působí jako silný fytokomplex [41].

1.3.3 Antimikrobiální účinek

Lichořeřišnice se používá k léčbě proti gram negativním a gram pozitivním bakteriálním infekcím, které jsou doprovázeny reakcemi zánětlivých buněk [43, 45]. Antimikrobiální účinek rostliny je spojen s obsahem glukotropaeolinu a jeho rozkladným produktem benzyl-isothiokyanátem. Glukotropaeolin je aromatický glukosinolát, který rostlina vyrábí v poměrně vysokých koncentracích. Prostřednictvím endogenního enzymu myrozinázy, který rostlina přirozeně obsahuje, dochází k hydrolyze glukotropaeolinu a uvolňuje se benzyl-isothiokyanát. Glukotropaeolin i enzym myrozináza jsou umístěny v různých částech neporušených tkání rostliny. Pokud je však rostlinná tkáň porušena, glukotropaeolin se hydrolyzuje aktivitou myrozinázy a uvolňuje se tím řada produktů rozkladu, včetně biologicky aktivních isothiokyanátů, které se vyznačují antimikrobiálními, antifungálními a virostatickými účinky. Pro uvolnění benzyl-isothiokyanátu je důležitá hodnota pH, během které dochází k degradaci glukotropaeolinu. Benzyl-isothiokyanát vzniká pouze za podmínek neutrálního pH. Jeho maximální účinnost proti bakteriím je v rozmezí pH 6-8. V kyselém prostředí mohou vznikat aminy a nitrily [44].

1.3.4 Další účinky

Příznivý vliv lichořeřišnice na lidské zdraví je také způsoben obsahem karotenoidů v rostlině [46]. β -karoten je spolu s dalšími karotenoidy zdrojem provitaminu A. Vitamin A je rozpustný v tucích a je velmi důležitý pro zrak. Vitamin A také pomáhá posílit schopnost imunitního systému odolat infekcím, hraje roli ve správném růstu, vývoji, gastrointestinálním funkcím a funkčnosti reprodukčních systémů [47]. Karotenoidy snižují riziko degenerativních onemocnění, mezi které patří rakovina, kardiovaskulární onemocnění, šedý zákal a makulární degenerace. Pozitivní vliv karotenoidů na lidský organismus je zprostředkován antioxidační aktivitou, regulací buněčného růstu, inhibicí buněčné proliferace a zvýšením buněčné diferenciaci [46].

Lichořeřišnice větší se používá i při onemocnění dýchacích cest. V lidové medicíně byla často užitečným lékem při onemocnění plic a průdušek. Vyznačuje se antiseptickým a expektorantním účinkem a pomáhá při rýmě. Odvar z rostliny kombinovaný s cukrem či medem je účinný při léčbě kašle, chrapotu a nachlazení. Konzumace listů inhibuje růst bakterií zodpovědných za zánět plic [6].

Semena lichořeřišnice větší obsahují velké množství kyseliny erukové, která je jednou z hlavních složek léku používaného k léčbě adrenoleukodystrofie, což je dědičná porucha lipidového metabolismu. Onemocnění se projevuje kumulací mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem s následnou neúčinností kůry nadledvin, ztrátou myelinu z nervových vláken a nefunkčností mužských pohlavních žláz. Směs kyseliny olejové a erukové izolovaných z rostliny, tzv. Lorenzův olej, normalizuje množství mastných kyselin s dlouhým řetězcem a snižuje závažnost projevů onemocnění [6].

Extrakt připravený ze sušené rostliny má příznivý účinek na žaludek a silně stimuluje trávicí systém. Napomáhá urychlení metabolismu a předchází vzniku žlučových kamenů [6].

1.4 Sklizeň

Lichořeřišnice větší by měla být sklizena za chladného počasí během vrcholu květu, protože v této době dosahuje nejlepší chuti. Měly by být vybírány pouze rostliny bez hmyzu a rostliny, které nejeví známky nemoci. Je třeba se vyvarovat sběru neotevřených a také vybledlých nebo zvadnutých květů, jelikož mohou mít hořkou chuť. Rostliny, které byly postříkány pesticidy, rostliny, které rostou podél silnic nebo které byly pohnojeny neošetřeným hnojivem nesmí být nikdy sklizeny pro stravovací účely, protože mohou být toxické nebo způsobit onemocnění z důvodu přítomnosti patogenů. Rostlina, která má sloužit jako potravina, by neměla být kupována v květinářství ani zahradnických střediscích, jelikož

je velké riziko ošetření rostliny syntetickými hnojivy a pesticidy, což může být velmi nebezpečné pro lidské zdraví. Stonek, kališní lístky a pestíky by měly být před použitím odstraněny. Důvodem odstranění kališních lístků z rostliny je jejich kyselost. Pyl může mírně snižovat chuť rostliny, a je také zdrojem alergie u mnoha lidí [45].

1.5 Technologie po sklizni

Lichořeřišnice patří mezi rostliny, které jsou choulostivé a velmi lehce podléhají zkáze. Po sklizni jsou květy náchylné k oddělení okvětních lístků, změnám barvy, zvlhnutí a dehydrataci. Jejich trvanlivost během dvou až pěti dnů po sklizni může být zvýšena udržováním v chladném prostředí o teplotě mezi 4 až 6°C. Při teplotě od 0 do 2,5°C je udržena jejich dokonalá vizuální kvalita až do dvou týdnů po sklizni. Zachování křehké struktury a ochranu před vysušením nám zajišťují plastové obaly, nejčastěji na bázi polyethylentereftalátu (PET) nebo polyvinylchloridu (PVC). U PVC je však v rostlině zaznamenána větší ztráta vody, než je tomu u ostatních druhů balení. Bylo zjištěno [45], že PET je s ohledem na dobu skladování lichořeřišnice výhodnější než PVC, protože nedochází ke ztrátě kvality a antioxidační kapacity. Skladování po dobu pěti dnů neovlivní komerční a zdravotní kvalitu rostliny.

1.6 Antioxidační kapacita

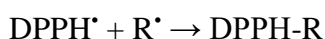
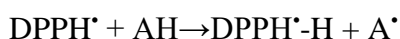
Volné radikály se přirozeně vyskytují v širokém spektru biologických i chemických systémů. Jsou to chemicky stabilní atomy a molekuly, které mají jeden volný elektron v elektronovém obalu [50]. Tyto reaktivní druhy kyslíku a dusíku jsou schopny oxidovat buněčné proteiny, nukleové kyseliny a lipidy [48]. Jsou zodpovědné za mnoho patologických procesů a způsobují sekundární poškození biologických systémů a buněk [50] Přispívají k buněčnému stárnutí, mutagenezi, karcinogenezi a srdečním onemocněním [48].

Antioxidanty jsou sloučeniny, které jsou schopné zpomalit nebo inhibovat oxidační procesy. Mezi endogenní antioxidanty patří enzymy, jako je superoxid dismutáza, kataláza, glutathionperoxidáza, a neenzymatické sloučeniny, jako je kyselina močová, bilirubin, albumin a metalothioneiny. Pokud endogenní antioxidanty nejsou schopny zajistit dostatečnou ochranu organismu proti reaktivním druhům kyslíku a dusíku, je nutné využít exogenní antioxidanty, jako doplňky stravy. Mezi nejznámější exogenní antioxidanty patří vitamin E, vitamin C, β -karoten, flavonoidy, minerální selen, vitamin D a vitamin K₃. Antioxidační kapacita je jedním ze způsobů, jak definovat schopnost organismu bránit se volným radikálům [49].

1.6.1 Metody měření antioxidační kapacity

1.6.1.1 Metoda DPPH

Při této metodě se využívá 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazil (DPPH), který se v roztoku vyskytuje jako stabilní volný radikál. Jeho stabilita je způsobena delokalizací volného elektronu v celé molekule, což je zároveň důvodem fialového zbarvení jeho roztoku. Test je založen na schopnosti volného radikálu reagovat s donory vodíku. Po redukci antioxidantem (AH) nebo radikálem (R[•]) se původně fialový roztok odbarví [49].



1.6.1.2 Metoda ABTS

ABTS kationtový radikál (ABTS^{•+}) je vytvořen ztrátou elektronu atomem dusíku ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina). ABTS lze oxidovat peroxodisíranem draselným nebo oxidem manganickým. Kationtový radikál absorbuje při 743 nm a dává modrozelené zbarvení. Za přítomnosti antioxidantu dojde k odbarvení roztoku [5, 49, 50].

1.6.1.3 Metoda FRAP

Metoda je založena na redukci komplexů železa TPTZ (2,4,6-tripyridyl-1,3,5-triazinu) s hexahydrátem chloridu železitého. Vazba železnatého iontu na ligand vytváří velmi intenzivní tmavě modré zbarvení. Metoda není schopna detekovat pomalu reaktivní polyfenolové sloučeniny a thioly [49, 50].

1.6.1.4 Metoda ORAC

Fluorescenční metoda široce používaná pro stanovení antioxidační kapacity v biologických vzorcích. Je založena na inhibici oxidace indukované peroxysloučeninami, iniciované tepelným rozkladem azosloučenin, jako je 2,2'-azobis-(2-aminopropan) dihydrochlorid (AAPH). Jako fluorescenční sonda je použit fluorescein. Detekce je založena na sledování úbytku fluorescence po reakci s peroxylovým radikálem [49].

1.6.1.5 Metoda PFRAP

Metoda je založena na reakci sloučenin s antioxidační kapacitou s ferrikyanidem draselným za vzniku ferokyanidu draselného. Ten poté reaguje s chloridem železitým za vzniku modrého komplexu ferokyanidu železitého, který absorbuje při 700 nm [49].

1.6.1.6 Metoda CUPRAC

Vzorek je smíchán se síranem měďnatým a neocuproinem. Po třiceti minutách je měřena absorbance při 450 nm. Působením antioxidantů dodávajících elektrony, je Cu^{2+} zredukován na Cu^+ [49].

1.6.1.7 Metoda TRAP

Metoda využívá chemiluminiscenci, která je podpořena produkcí radikálů luminolu vzniklých tepelným rozkladem 2,2'-azobis-(2-aminopropan) dihydrochloridu (AAPH). Po přidání vzorku obsahujícího antioxidanty jsou peroxylové radikály vychytávány. Antioxidační kapacita je stanovena z doby, během které byl vzorek schopen uhasit chemiluminiscenční signál [49, 51].

1.6.1.8 Cyklická voltametrie

Patří mezi elektrochemická měření, kdy se na pracovní elektrodu vkládá potenciálový pulz a zaznamenává se příslušná intenzita proudu. Získaným záznamem je cyklický voltamogram. Důležitými parametry jsou intenzity anodického a katodického proudu a velikost potenciálu. Čím nižší je hodnota anodického oxidačního potenciálu, tím látka lépe dokáže odevzdat elektrony a je lepším antioxidantem. Cyklická voltametrie je vhodná metoda pro získání informace, zda látka dokáže snadno odevzdat elektrony. Je vhodné ji kombinovat s další metodou pro stanovení antioxidační kapacity [49, 52].

1.6.2 Antioxidační účinek, stanovení antioxidační kapacity a celkového množství fenolických látek

Hlavní antioxidační účinek lichořeřišnice je způsoben přítomností flavonoidů, fenolických látek a anthokyaninů [45], které se ve velkém množství nachází v květech rostliny. Dalším zdrojem antioxidačního účinku je kyselina askorbová.

Antioxidační kapacita extraktů z lichořeřišnice je nejčastěji stanovena metodou DPPH [5, 53, 54], ABTS [5, 55], ORAC [9, 55] nebo FRAP [54] a je často přepočítána na koncentraci standardu Troloxu, z tohoto důvodu je označována jako TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) [55]. Bylo zjištěno [5], že lichořeřišnice má větší antioxidační aktivitu (458 $\mu\text{mol TE/g FW}$) než borůvky (45,9 $\mu\text{mol TE/g FW}$), jež jsou jedním z nejbohatších zdrojů antioxidantů nebo než druh *Rubus* (0-25,3 $\mu\text{mol TE/g FW}$), kam se řadí ostružiník. Hodnota stanovená metodou DPPH (91,9 $\mu\text{mol TE/g FW}$) byla srovnatelná s hodnotou pro brusinky (92,9 $\mu\text{mol TE/g DW}$) nebo jahody (121,6 $\mu\text{mol TE/g DW}$).

Antioxidační kapacita je závislá na několika parametrech, jako je čas, teplota a přítomnost různých rozpouštědel. Důležitou roli hraje provedení extrakce vzorku. Antioxidační kapacitu ovlivňuje přítomnost flavonoidů, fenolových kyselin, alkaloidů, vitaminů a karotenoidů. U fenolických sloučenin antioxidační účinnost závisí na jejich stabilitě v různých systémech a na počtu a umístění hydroxylových skupin [45, 56].

Celkové množství fenolických látek lze stanovit spektrofotometrickou metodou FCM (metoda Folin-Ciocalteu) s využitím Folin-Ciocalteuova činidla. Reakce probíhá v prostředí uhličitanu sodného a dochází ke změně barvy ze žluté na modrou. Absorbance je měřena při 750 nm a množství přepočítáno na kyselinu gallovou (GAE) [5, 55].

1.7 Úprava vzorku

1.7.1 Extrakce kapalina-kapalina

Tato extrakční technika je založena na dělení analytu mezi dvě vzájemně nemísitelné nebo omezeně mísitelné kapalně fáze. Látky se mezi tyto fáze rozdělují na základě rozdílných rozdělovacích koeficientů v použitých rozpouštědlech [57]. Patří mezi nejstarší extrakční techniky, avšak díky své jednoduchosti má široké uplatnění v předseparační úpravě vzorků. Její nevýhodou je časová náročnost a spotřeba velkého množství často toxických organických rozpouštědel [58]. Právě výběr rozpouštědla je velmi důležitý a závisí na specifické povaze měřené bioaktivní sloučeniny. Průběh extrakce je ve velké míře ovlivněn volbou teploty. Nejčastěji extrakce probíhá při pokojové teplotě, mohou být však uplatněny i vyšší teploty okolo 35, 60 a 100°C nebo teploty nízké, okolo 4°C. Při použití vysokých teplot se doba extrakce zkracuje, naopak za nízkých teplot se doba extrakce obvykle prodlužuje [45]. Extrakce v systému kapalina-kapalina se používá u analýz, při kterých nemůže být využita destilace nebo krystalizace, nebo pokud dochází k dělení složek citlivých na teplo nebo jsou složky relativně netěkavé [57].

1.7.2 Extrakce ultrazvukem

Vlivem ultrazvuku dochází k narušení buněčných stěn rostlinného materiálu. To má za následek lepší průnik rozpouštědla do pevného vzorku a snadnější uvolnění extrahovaných látek [59]. Vzorek je ponořen do rozpouštědla a po určité době je aplikována ultrazvuková energie. Následně je extrakt od tuhého zbytku oddělen centrifugací [9]. Extrakční výtěžek může být zvýšen prostřednictvím kavitace, což je vznik mikrobublin v kapalině vlivem dostatečné intenzity ultrazvuku. Bublínky absorbují energii ultrazvukových vln a periodicky

se kapalina zhušťuje a zředuje. Zvýšení tlaku a teploty vede k zániku bublin a způsobuje nárazovou vlnu, která prochází rozpouštědlem a zvyšuje přenos hmoty v systému [59].

1.7.3 Soxhletova extrakce

Při této extrakční technice je vzorek umístěn do patrony v Soxhletově extraktoru. Dále je dávkováno kondenzované extrakční činidlo a dochází k vymývání rozpustných složek z matrice vzorku. Kapalina s analyty je vrácena do varné baňky a proces je opakován, dokud nedojde k vyextrahování dostatečného množství látky. Výhodou techniky jsou nízké pořizovací náklady, naopak nevýhodou je dlouhá doba potřebná k extrakci a velké množství extrahovaného materiálu, které je nutné zlikvidovat [45, 60, 61]. Modernější variantou Soxhletovy extrakce je systém Soxtec, u kterého dochází k ponoření vzorku do horkého rozpouštědla a následnému propláchnutí kondenzujícím rozpouštědlem. Výhodou systému Soxtec je úspora času a extrakčního činidla [61].

1.7.4 Lyofilizace

Lyofilizace je při analýze rostlinného materiálu často součástí úpravy vzorku [4, 55, 62]. Je to stabilizační proces, při kterém je látka nejprve zmrazena a poté se množství rozpouštědla redukuje nejprve sublimací (primární sušení) a pak desorpčí (sekundární sušení). Lyofilizovaný materiál si tak uchovává původní složení a texturu, která se by se sušením při velmi vysoké teplotě mohla zničit [63].

1.7.5 Macerování

Při úpravě vzorku je také možné použít macerování [40, 41, 45, 62]. Vhodně rozdrcený rostlinný materiál je v nádobě smíchán s rozpouštědlem. Systém je tak ponechán obvykle sedm dní. Příležitostné promíchání napomáhá difúzi a zajišťuje rozptýlení koncentrovaného roztoku, který se hromadí kolem povrchu částic. Po uplynutí doby macerování je kapalina slita a pevný zbytek opatrně prolisován. Kapalina se poté čistí filtrací [64].

1.8 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) je v současnosti jednou z nejpoužívanějších technik analytické chemie, která má široké uplatnění v analýze vzorků potravin, životního prostředí, biochemie a farmaceutického průmyslu [65]. Vzorek je nastříknut do kolony, která je naplněna vhodnou stacionární fází, a přes kterou je za vysokého tlaku čerpána kapalná mobilní fáze. Principem

chromatografické separace je rozdílná rychlost migrace jednotlivých složek při průchodu chromatografickou kolonou. Analyty jsou mezi mobilní a stacionární fází v kontinuální rovnováze, ale po určité době jsou od sebe odděleny. Čas, který analyt stráví v mobilní nebo stacionární fázi, je ovlivněn jeho afinitou k příslušným fázím [65-67]. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je vhodná pro separaci netěkavých, tepelně nestálých, nepolárních až iontových organických látek [65].

1.8.1 Instrumentace

Srdcem kapalinového chromatografu je chromatografická kolona [65, 68]. V kapalinové chromatografii se používají náplňové kolony z nerezové oceli s délkou 5-30 cm, vnitřním průměrem 2-4,6 mm naplněné částicemi o průměru 2-5 μm [66, 69, 70]. Kolony mohou být naplněny silikagelem, oxidem hlinitým, grafitickým uhlíkem nebo tuhým polymerem, na něž mohou být vázány různé stacionární fáze. Možné je také použití hybridních stacionárních fází, které jsou kombinací anorganického silikagelu a organického organosilanu. Jejich povrch je modifikován trifunkčními silany. Tyto fáze spojují výhody silikagelu a polymeru, čímž zajišťují mechanickou, chemickou i tepelnou stabilitu [71]. Nejčastěji se však jako nosič používá silikagel [65, 72].

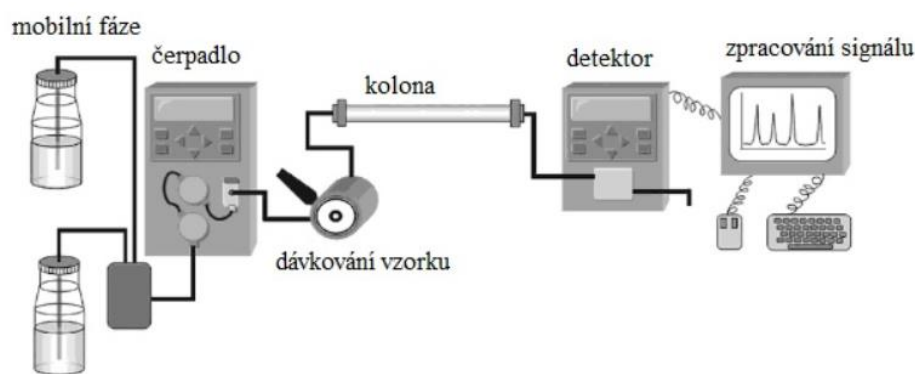
Mobilní fáze je čerpána vysokotlakým čerpadlem. V závislosti na rozměrech kolony, velikosti částic stacionární fáze, průtoku a složení mobilní fáze může být dosaženo pracovních tlaků okolo 40-60 MPa [69].

Součástí kapalinového chromatografu je nejčastěji šesticestný dávkovací ventil, který umožňuje manuální či automatické nadávkování analyzovaného vzorku do toku mobilní fáze. Zavádí se malé množství vzorku okolo 2-20 μl [68, 69].

Současným trendem v HPLC je miniaturizace a dochází ke zmenšování rozměrů kolon a průměrů částic. Pokud je velikost částic v koloně menší než 2 μm , jedná se o ultravysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (UHPLC), která pracuje při vyšších tlacích, okolo 150 MPa, než běžná HPLC a poskytuje větší rozlišení, citlivost a rychlost analýzy [70, 73]. Velikost používaných částic se pohybuje od 1,5 do 2 μm , kolony mají délku 50-150 mm a vnitřní průměr kolem 2,1 mm. Kromě kolon s celkově porézními částicemi menšími než 2 μm mohou být použity povrchově porézní částice, které jsou tvořeny neporézním jádrem a vrstvou porézního silikagelu. Jejich využití zlepšilo účinnost chromatografické separace v systémech s obrácenými fázemi díky pravidelnější distribuci, hustotě naplnění kolony a urychlení kinetiky přenosu hmoty. V mikro- a nano- kapalinové chromatografii se využívají kolony s průměrem menším než 1 mm. Čerpadlo zajišťuje velmi

nízké průtoky při vysokých tlacích, jež jsou důsledkem miniaturních průměrů kapilár. Miniaturizaci kapalinové chromatografie zajišťuje také uspořádání na čipu. Pro výrobu čipů jsou využívány různé materiály, mezi něž patří polymery, sklo, křemen nebo oxid křemičitý. Jejich velkou předností je redukce mrtvých objemů systému. Miniaturizace v kapalinové chromatografii přinesla některé výhody, jako je malá spotřeba vzorku, nízká spotřeba mobilní fáze a menší naředění vzorku na chromatografické koloně [71].

Na konci chromatografického systému je umístěn detektor, který na základě fyzikálně-chemických principů detekuje rozseparované látky odtékající z chromatografické kolony. Nejčastěji je používán spektrofotometrický detektor, který poskytuje vysokou citlivost pro rutinní analýzu. Detektor indexu lomu (RI) je ideální volbou při analýze látek s omezenou nebo žádnou absorpcí UV záření [65, 68]. Zde lze také využít univerzální detektory na bázi aerosolu (ELSD a CAD). Fluorescenční detektor je vysoce citlivý, a protože lze jeho průtokové cely snadno miniaturizovat, využívá se v mikrokolonové kapalinové chromatografii. Elektrochemické detektory se používají k detekci látek schopných elektrochemické reakce na rozhraní elektroda-roztok. Dále lze využít detektor vodivostní či refraktometrický, které se řadí mezi univerzální detektory [71].



Obrázek 13: Základní schéma HPLC [67].

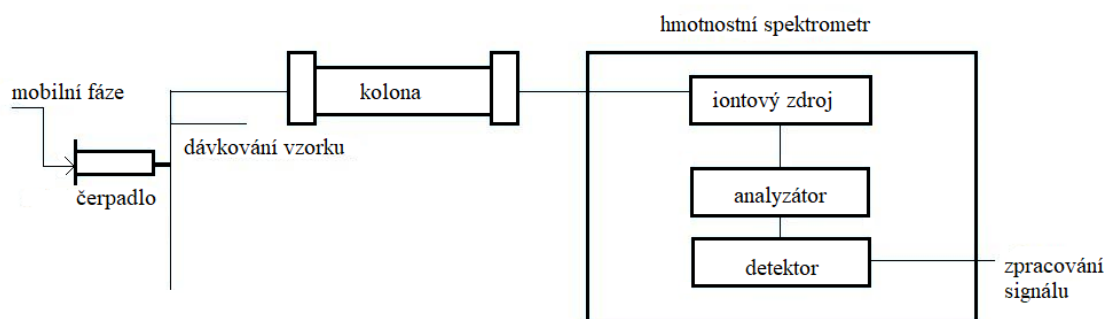
Chromatografická separace může být provedena v systémech s normálními fázemi (NP-HPLC), kdy je stacionární fáze polárnější než fáze mobilní, kterou je nejčastěji hexan, methylchlorid, chloroform či diethylether. U systému s obrácenými fázemi (RP-HPLC) je naopak polárnější mobilní fáze a tvoří ji směs vody a acetonitrilu či methanolu [68, 69]. Stacionární fáze má nepolární charakter a tvoří ji dlouhé uhlíkaté řetězce navázané na povrch nosiče. Nejčastěji používanou fází je oktadecylsilikagel (C_{18}), dále lze využít polyaminovou,

propylkyanovou, diolovou, fenylovou, pentafluorofenylovou, propylfenylovou či propylnitrofenylovou fází. Možné je použití silikagelových monolitických kolon, které poskytují vyšší průtoky mobilní fáze a jsou vhodné pro separaci malých molekul [71].

Separace látek může být provedena za izokratické eluce, kdy je složení mobilní fáze v průběhu analýzy konstantní. K rozdělení látek, které se podstatně liší v retenci, se používá gradientová eluce, při které koncentrace silnější složky v mobilní fázi roste s časem [65, 68].

1.9 Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií

Výhodou spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie je umožnění separace a identifikace látek v jedné analýze [74]. Hmotnostní spektrometr se skládá z iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a z detektoru. Složky vzorku jsou po chromatografickém rozdělení zavedeny do iontového zdroje, kde dochází k ionizaci. Ionty jsou následně transportovány do analyzátoru, který ionty rozděluje podle poměru hmotnosti a náboje (m/z). Detektor pak zaznamenává proud indukovaný dopadem iontu na povrch. Výsledkem je hmotnostní spektrum [75].



Obrázek 14: Základní schéma HPLC/MS [76].

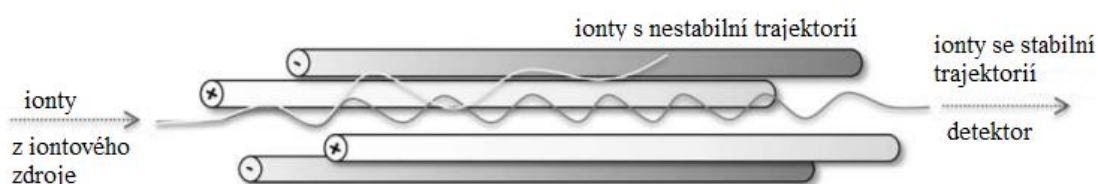
1.9.1 Ionizace elektrosprejem

Ionizace elektrosprejem je měkká ionizační technika, která slouží k určení molekulové hmotnosti iontových a polárních látek [74, 75]. Řadí se mezi ionizační techniky pracující za atmosférického tlaku, které jsou nejvhodnější pro spojení HPLC/MS [74]. Umožňuje použití průtoku mobilní fáze až do 1 ml/min v rozsahu od 100 % organické složky do 100 % vody [74]. Principem je aplikace vysokého napětí na velmi úzkou kovovou kapiláru, kterou je

přiváděn eluát z kapalinového chromatografu. Na konci kapiláry dochází k rozprášení eluátu a tvorbě nabitého aerosolu. Rychlým odpařováním vznikajících kapiček dochází ke zvyšování hustoty náboje a po překročení kritické hodnoty dochází k tzv. Coulombické explozi, která způsobí rozpad na ještě menší kapičky. Celý proces se opakuje až dojde k uvolnění iontu, který je veden do hmotnostního analyzátoru [75, 77].

1.9.2 Kvadrupólový analyzátor

Tvoří ho čtyři tyče, kdy na dvě protilehlé je vloženo kladné stejnosměrné napětí a na zbývající dvě záporné stejnosměrné napětí. Na všechny tyče je pak vloženo vysokofrekvenční střídavé napětí. V určitém okamžiku, na základě velikosti stejnosměrného napětí a amplitudy střídavého napětí se iont s určitou hodnotou m/z pohybuje po stabilní trajektorii dále do detektoru. Ionty, které trajektorii stabilní nemají, jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu. Postupnou změnou velikosti stejnosměrného napětí a amplitudy střídavého napětí projdou do detektoru i zbývající ionty [77]. Výhodou kvadrupólového analyzátoru je nízká cena, jednoduchost a schopnost pracovat za vyššího tlaku, než je tomu u vysokorozlišovacích sektorových analyzátorů. Jeho nevýhodou je nízká rozlišovací schopnost [74, 77].



Obrázek 15: Schéma kvadrupólového analyzátoru [77].

Možné je také použití trojitého kvadrupólu, který je tvořen třemi za sebou uspořádanými kvadrupóly, kde prostřední slouží jako kolizní cela. Prekursorové ionty letící z prvního kvadrupólu jsou podrobeny srážkám v kolizní cele a následné analýze fragmentových iontů ve třetím kvadrupólu. Výhodou trojitého kvadrupólu je umožnění MS/MS analýz, nízká cena, vysoká citlivost, specifická a robustnost při práci se složitými biologickými matricemi [77].

1.10 Stanovení fenolických látek v lichořeřišnici větší pomocí chromatografických metod

Velmi důležitým krokem analýzy fenolických látek je jejich extrakce z matrice vzorku. Před samotnou extrakcí je část rostliny určená k analýze důkladně omyta vodou pro zbavení nečistot [53] a následně usušena na vzduchu [41, 53] nebo při teplotě okolo 40°C [2, 39, 40]. Jinou variantou je zmrazení vzorku při teplotě -70°C [2, 4, 9]. Poslední možností úpravy před extrakcí je většinou lyofilizace [9, 39, 55].

Nejpoužívanější technikou je extrakce v systému kapalina-kapalina [2, 9, 40-42, 55, 77, 53]. Při této technice jsou nejčastěji používanými rozpouštědly methanol [45, 62] či ethanol [40, 53] a jejich vodné roztoky [2, 45, 55, 78]. Mohou být však použita i jiná rozpouštědla, jako je aceton [5, 9], isopropanol, ether, voda a tetrahydrofuran [45]. Macerace probíhá nejčastěji za použití 60% [53], 70% [41] nebo 90% [40] ethanolu po dobu sedmi dní. Průběh extrakce je ve velké míře ovlivněn volbou teploty. Nejčastěji extrakce probíhá při pokojové teplotě, mohou být však uplatněny i vyšší teploty okolo 35, 60 a 100°C nebo teploty nízké, okolo 4°C [45]. Pro minimalizaci oxidace sloučenin mohou být roztoky propláchnuty dusíkem a extrakce je prováděna ve tmě [55]. Extrakce fenolických látek může být provedena také Soxhletovým extraktorem za použití methylenchloridu a ethanolu [60]. Dalším typem je extrakce ultrazvukem za použití 70% vodného acetonu pod dusíkovou atmosférou, při které je aplikována ultrazvuková energie o frekvenci 50 kHz po dobu deseti minut [9].

Pro separaci je nejvíce využívána vysokoúčinná kapalinová chromatografie v systémech s obrácenými fázemi. Separace probíhá na koloně plněné oktadecylsilikagelovou stacionární fází (C18). K ochraně samotné analytické kolony se využívá odpovídající předkolonka umístěná mezi dávkovačem a analytickou kolonou [2, 5, 41, 42, 53-55]. Separace je prováděna velmi často za podmínek gradientové eluce [2, 40-42, 54], nebo se využívá kombinace s izokratickou elucí [53, 78]. Jako mobilní fáze jsou nejčastěji využity vodné roztoky methanolu a acetonitrilu [2, 42, 53-55]. Do vodné fáze je nutný přídavek kyseliny mravenčí [2, 55, 54], octové [42, 53] nebo fosforečné [9], které sníží pH a umožní optimální podmínky pro separaci fenolických látek. Detekčním systémem je spektrofotometrický detektor [40-42, 53, 55] měřící v rozsahu vlnových délek 200-600 nm [55]. Běžné je spojení kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem, kde je využita ionizace elektrosprejem [2, 40-42, 55, 62]. Jako analyzátor slouží kvadrupól [42, 62] nebo iontová past [55].

1.11 Stanovení glukosinolátů v lichořeřišnici větší pomocí chromatografických metod

Rostlina je před analýzou zpracována obdobným způsobem jako při analýze fenolických látek. Určitou část je možné buď usušit nebo zmrazit a následně rozdrtit na prášek [79]. K extrakci glukosinolátů z matrice vzorku je nejvíce využívána technika extrakce v systému kapalina-kapalina, přičemž nejčastěji používaným rozpouštědlem je 70% methanol [79, 80-83]. Dále lze využít tlakovou kapalinovou extrakci (PLE) za použití 70% ethanolu jako extrakčního rozpouštědla [84]. Extrakce může být podpořena mikrovlnným ohřevem [85, 86].

Glukosinoláty jsou ve výsledném extraktu analyzovány přímo pomocí HPLC [79-81, 83, 87] nebo UHPLC [84, 88] v systémech s obrácenými fázemi, častěji jsou však před analýzou podrobeny desulfataci [79, 81, 82, 87]. Desulfatace může být provedena na iontoměničové koloně (Sephadex A-25) za přítomnosti sulfatázy [79, 81, 82]. Kolona je nejprve aktivována octanem sodným a po přidání sulfatázy ponechána stát 18 hodin při 20°C [82]. Desulfatované glukosinoláty jsou eluovány nejméně třikrát destilovanou vodou a nadávkovány do HPLC systému [79, 81, 82].

Separace glukosinolátů je uskutečněna zpravidla za podmínek gradientové eluce [79, 83, 85, 86]. Mobilní fázi tvoří opět binární systém, kde jednu složku tvoří voda [79, 81] s přídavkem kyseliny mravenčí [80, 84] nebo mravenčanu amonného [85], který je vhodným ion-párovým činidlem poskytující zlepšení tvaru píku při přímé analýze. Druhou organickou složku tvoří acetonitril [79, 81] nebo methanol [80] do nichž může být také přidána kyselina mravenčí [84, 85]. K detekci látek rozdělených na chromatografické koloně slouží spektrofotometrický detektor [79, 81] nebo hmotnostní spektrometr [84-87] s využitím ionizace elektrosprejem [84-88].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Přístroje a zařízení

K separaci fenolických látek s glukosinolátem byl použit kapalinový chromatograf ve spojení s hmotnostním spektrometrem QTRAP 4500 (ABSCIEX, USA). Kapalinový chromatograf byl složen z čerpadel mobilní fáze LC-20AD (Schimadzu, Kyoto, Japonsko), směšovače mobilní fáze (Schimadzu, Kyoto, Japonsko), autosampleru SIL-20A (Schimadzu, Kyoto, Japonsko) a termostatu kolon LCO 102 single (Ecom, Praha).

K separaci látek byly použity kolony:

- Kinetex Polar C18, 150 × 3 mm; 2,6 μm částice (Phenomenex, USA)
- Ascentis Express C18, 150 × 3 mm; 2,7 μm částice (Supelco, USA)
- Luna Omega PS C18, 150 × 3 mm; 5 μm částice (Phenomenex, USA)

Měření antioxidační kapacity, fotometrické měření celkového množství anthokyaninů a fenolických látek bylo provedeno na UV/VIS spektrofotometru Schimadzu UV-2450 (Kyoto, Japonsko). Pro měření byla použita kyveta S/G10, optická délka 10 mm (Fisher Scientific, Německo).

Vzorky rostliny byly rozemlety s využitím homogenizátoru ULTRA TURRAX T 18 (IKA, Německo). Pro přípravu vzorků a standardů byly použity mikropipety Biohit-Proline (Biohit, Finsko) s nastavitelným objemem. Pro přečištění vzorků před analýzou byly použity filtry PTFE o velikosti pórů 0,45 μm (Labicom, Česká republika). Dále byly použity analytické váhy (Sartorius, Ústí nad Labem), pH metr (Methrom 827, Švýcarsko), injekční stříkačky (3 ml), vialky (4; 8 ml) a odměrné a běžné laboratorní sklo.

2.2 Použité chemikálie

2.2.1 Chemikálie

Na přípravu mobilní fáze byl použit acetonitril (HPLC/MS čistota, Sigma Aldrich, USA) a deionizovaná voda, která byla připravena pomocí zařízení Mili-Q (Merck, Německo). Do mobilní fáze byla přidána kyselina mravenčí (Sigma Aldrich, USA). Ke stanovení antioxidační kapacity a celkového množství fenolických látek a anthokyaninů byla použita ABTS diamonná sůl, 2M Folin-Ciocalteuovo činidlo a DPPH (vše Sigma Aldrich, USA), octan sodný, chlorid draselný, uhličitan sodný (vše Lach-Ner, Neratovice) a peroxodisíran

draselný (Laborchemie Apoldo, Německo). Dále byl použit methanol, ethanol, mravenčan amonný (vše Sigma Aldrich, USA) a kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, Neratovice).

2.2.2 Standardy

Pro výpočet antioxidační aktivity byl použit standard Troloxu o koncentraci 0,01 mol/l. Ke stanovení obsahu fenolických látek byl připraven standard kyseliny gallové o koncentraci 1 g/l. Připravené kalibrační roztoky byly přidávány ke 3 ml reakční směsi místo analyzovaného vzorku. Pro chromatografickou analýzu byl připraven zásobní roztok kyseliny chinové, chlorogenové a glukotropaeolinu o koncentraci 1 g/l, zásobní roztok astragalinu o koncentraci 0,75 g/l a isoquercitrinu o koncentraci 0,4 g/l. Jako vnitřní standardy byly použity kyselina 4-hydroxybenzoová, kávová, *o*-kumarová, *p*-kumarová, jejichž zásobní roztok měl koncentraci 1 g/l a kaempferol-rutinosid o koncentraci 0,63 g/l. Všechny standardy byly rozpuštěny v methanolu. Kalibrační roztoky byly doplněny směsí acetonitril/voda o pH 2,5. Rozmezí kalibrační řady jednotlivých standardů je uvedeno v tabulce 2.

Tabulka 2: Koncentrační rozsahy standardů.

standard	koncentrační rozsah
Trolox	0,032 – 0,288 $\mu\text{mol}/40 \mu\text{l}$
kyselina gallová	0,0025 – 0,03 $\text{mg}/50 \mu\text{l}$
kyselina chinová	0,00101 – 10,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$
kyselina chlorogenová	0,00103 – 10,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$
astragalin	0,00225 – 22,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$
isokvercitrin	0,002 – 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$
glukotropaeolin	0,01 – 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$
kaempferol-rutinosid	0,19 – 0,57 $\mu\text{g}/\text{ml}$
kyselina 4-hydroxybenzoová	0,104 – 0,312 $\mu\text{g}/\text{ml}$
kyselina kávová	0,05 – 0,15 $\mu\text{g}/\text{ml}$
kyselina <i>o</i> -kumarová	0,05 – 0,15 $\mu\text{g}/\text{ml}$
kyselina <i>p</i> -kumarová	0,05 – 0,15 $\mu\text{g}/\text{ml}$

2.2.3 Vzorky

Pro experimentální část diplomové práce bylo použito 25 vzorků lichořeřišnice větší. Jednotlivé části rostliny, úprava před skladováním, váha čerstvého vzorku, vlhkost, místo a doba sběru jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3: Vzorky.

vzorek	část rostliny	místo sběru	datum sběru	úprava před skladováním	FW [g]	vlhkost [%]
B1	bobule	Svítkov	14.11.2018	sušení	5,64	86,71
L1	listy	Svítkov	14.11.2018	sušení	4,91	85,14
Č1	květy červené	Svítkov	14.11.2018	sušení	4,4	91,6
Ž1	květy žluté	Svítkov	14.11.2018	sušení	3,32	90,96
S1	stonek	Svítkov	14.11.2018	sušení	5,86	91,3
B1a	bobule	Svítkov	14.11.2018	sušení	5,35	83,56
L1a	listy	Svítkov	14.11.2018	sušení	5	81,2
Č1a	květy červené	Svítkov	14.11.2018	sušení	5,46	91,21
L1b	listy	Třebíč	25.11.2018	sušení	5	78
B2	bobule	Svítkov	14.11.2018	mražení	5,01	–
L2	listy	Svítkov	14.11.2018	mražení	5,32	–
Č2	květy červené	Svítkov	14.11.2018	mražení	5,4	–
Ž2	květy žluté	Svítkov	14.11.2018	mražení	3,64	–
L2c	listy	Svítkov	14.11.2018	mražení	5,27	–
L2d	listy	Svítkov	14.11.2018	mražení	5,18	–
Ž2c	květy žluté	Svítkov	14.11.2018	mražení	5,04	–
Ž2d	květy žluté	Svítkov	14.11.2018	mražení	5	–
Č2c	květy červené	Svítkov	14.11.2018	mražení	5,43	–
Č2d	květy červené	Svítkov	14.11.2018	mražení	4,9	–
Č3	květy červené	Svítkov	14.11.2018	čerstvé	5,06	–
K3c	směs květů	Svítkov	14.11.2018	čerstvé	5,32	–
L3	listy	Svítkov	14.11.2018	čerstvé	5	–
L3c	listy	Svítkov	14.11.2018	čerstvé	5,18	–
B3	bobule	Svítkov	14.11.2018	čerstvé	5,4	–
S3	stonek	Svítkov	14.11.2018	čerstvé	5,1	–

2.3 PRACOVNÍ POSTUPY

2.3.1 Příprava a extrakce vzorků

Přibližně 5 g vzorku (čerstvé váhy) bylo smícháno se 40 ml 70% methanolu a extrahováno s využitím homogenizátoru. Vzorky B1a, Č1a a L1a byly ve 40 ml 70% methanolu macerovány po dobu jedné hodiny, u ostatních vzorků byla extrakce provedena okamžitě. U vzorků L2c, Ž2c, Č2c, K3c a L3c bylo před extrakcí přidáno 0,3 % kyseliny mravenčí, u vzorků L2d, Ž2d a Č2d 1 % kyseliny mravenčí. Po extrakci byly vzorky centrifugovány po dobu 10 minut při 5000 ot/min.

2.3.2 Spektrofotometrické metody

2.3.2.1 Metoda ABTS

Tableta ABTS (10 mg) byla rozpuštěna v 5 ml destilované vody ($c = 3,6$ mmol/l). Následně bylo přidáno 100 μ l $K_2S_2O_8$ ($c = 0,064$ mol/l). Roztok byl ponechán za nepřístupu světla v chladničce po dobu 12-16 hodin. Ze zásobního roztoku bylo pipetováno 2,5 ml do 100 ml odměrné baňky a doplněno destilovanou vodou po rysku. Ke 3 ml reakční směsi bylo přidáno 40 μ l vzorku a důkladně promícháno. V případě studie rychlosti reakce byl měřen úbytek absorbance při vlnové délce 734 nm po 2 minutách do 10 minut, po 5 minutách do 30 minut, po 10 minutách do 60 minut a po 60 minutách do 180 minut. Pro zjištění celkové antioxidační kapacity byl měřen úbytek po 30 minutách. Úbytek absorbance byl pomocí kalibrační křivky přepočítán na ekvivalentní množství Troloxu.

2.3.2.2 Metoda DPPH

Do 25 ml odměrné baňky bylo naváženo 0,004 g DPPH a doplněno methanolem po rysku. Pracovní roztok byl dále methanolem naředěn v poměru 1:2. Ke 3 ml pracovního roztoku bylo přidáno 50 μ l vzorku a směs byla důkladně promíchána. V případě studie rychlosti reakce byl měřen úbytek absorbance při vlnové délce 515 nm po 2 minutách do 10 minut, po 5 minutách do 30 minut, po 10 minutách do 60 minut a po 60 minutách do 180 minut. Pro zjištění celkové antioxidační kapacity byl měřen úbytek po 30 minutách. Úbytek absorbance byl pomocí kalibrační křivky přepočítán na ekvivalentní množství Troloxu.

2.3.2.3 Stanovení celkového množství fenolických látek

Pracovní roztok pro stanovení celkového množství fenolických látek byl připraven naředěním 2 M Folin-Ciocalteuova činidla destilovanou vodou v poměru 1:20. Ke 2 ml činidla bylo přidáno 50 μ l vzorku. Směs byla promíchána a po 5 minutách byl přidán 1 ml

7,5% Na₂CO₃. Nárůst absorbance byl po 30 minutách změřen při 750 nm a přepočítán pomocí kalibrační křivky na ekvivalentní množství kyseliny gallové.

2.3.2.4 Stanovení celkového množství anthokyaninů

Pro stanovení celkového množství anthokyaninů byly připraveny dva pufrы o různém pH. 0,025 M roztok chloridu draselného (pufr pH 1) byl připraven rozpuštěním 0,93 g KCl v 490 ml destilované vody. Pomocí kyseliny chlorovodíkové bylo pH upraveno na hodnotu 1 a roztok byl doplněn destilovanou vodou na celkový objem 500 ml. 0,4 M octan sodný (pufr pH 4,5) byl připraven rozpuštěním 27,215 g octanu sodného v 490 ml destilované vody. Pomocí kyseliny chlorovodíkové bylo pH upraveno na hodnotu 4,5 a roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem 500 ml.

Ke 2,6 ml chloridu draselného bylo přidáno 400 μl vzorku a ke 2,6 ml octanu sodného bylo přidáno 400 μl vzorku. Absorbance byla měřena při 700 a 496 nm. Celkový obsah anthokyaninů byl vypočítán podle následujícího vzorce:

$$mg/l = \frac{A \cdot MW \cdot DF \cdot 1000}{\varepsilon \cdot l}$$

$$A = (A_{\lambda \text{ vis-max}} - A_{700})_{\text{pH1}} - (A_{\lambda \text{ vis-max}} - A_{700})_{\text{pH4,5}}$$

MW – molekulová hmotnost hlavního anthokyaninu ve vzorku (pelargonidin-3-glukosid)

DF – zředovací faktor

ε – molární absorpční koeficient (15 600 l·mol⁻¹·cm⁻¹)

l – délka kyvety

2.3.3 HPLC/MS analýza

Pro separaci fenolických látek s glukosinolátem byla použita kolona Kinetex Polar C18 (150 mm × 3 mm × 2,6 μm). Mobilní fáze byla složena z acetonitrilu a deionizované vody s přidavkem kyseliny mravenčí (pH 2,5). Průtok mobilní fáze byl 0,5 ml/min a teplota kolony 30°C. Nástřik vzorků byl 2 μl. Použitý gradient je zobrazen v tabulce 4.

Tabulka 4: Gradient.

čas [min]	acetonitril [%]
0	10
1	15
3	20
5	36
6	50
7	10

Optimalizace MRM přechodů byla pro látky s dostupnými standardy provedena pomocí přímé infúze do hmotnostního spektrometru. Pro ionizaci byl využit elektrosprej (ESI-) v režimu snímání záporných iontů.

Hmotnostní spektrometr při přímé infúzi pracoval za následujících podmínek: průtok 5 - 10 μl/min, ESI-, průtoky plynů podílejících se na rozprášení a sušení eluátu: „curtain gas“ 10 psi, „ion source gas 1“ – 20 psi a „ion source gas 2“ – 0 psi; collision gas – medium, ion spray voltage -4500 V, vstupní potenciál -10, deklasterační potenciál v závislosti na sloučenině (-60 V až -190 V).

Měření HPLC/MS probíhalo za následujících podmínek: průtok 0,5 ml/min, ESI-, průtoky plynů podílejících se na rozprášení a sušení eluátu: „curtain gas“- 20 psi, „ion source gas 1“- 40 psi a „ion source gas 2“- 50 psi; collision gas-medium, teplota 400°C, ion spray voltage -4500 V, vstupní potenciál -10, parametry MRM přechodů – deklasterační potenciál (DP), kolizní energie (CE) a výstupní potenciál kolizní cely (CXP) jsou uvedeny v tabulce 5 ve výsledkové a diskuzní části.

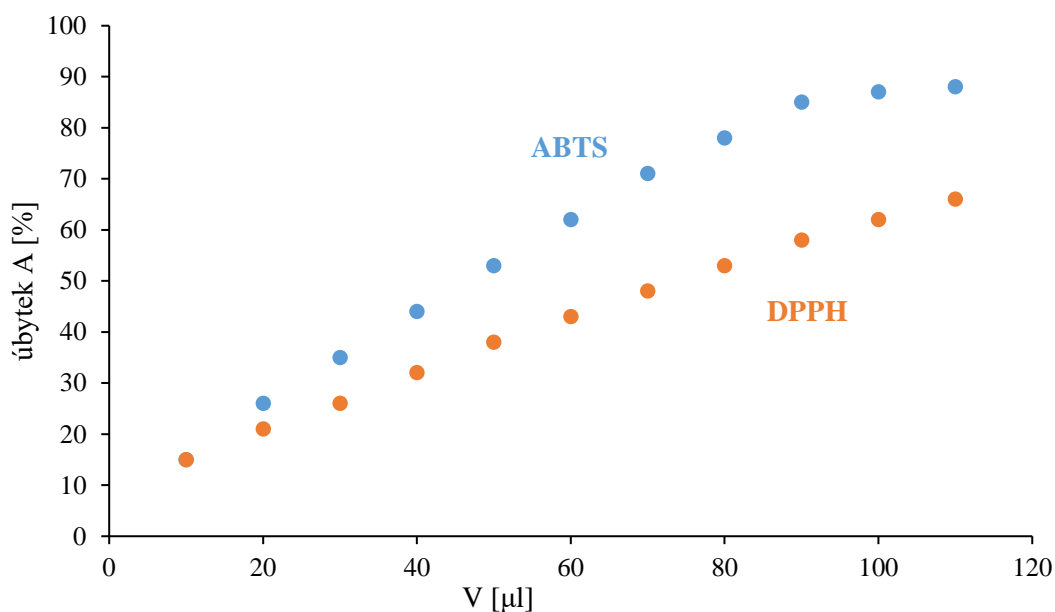
3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Stanovení antioxidační aktivity

Nejprve byla provedena optimalizace metody ABTS a DPPH pro stanovení antioxidační kapacity fenolických látek obsažených ve vzorcích lichořeřišnice větší. K optimalizaci metod byl použit vzorek směsi květů. Vhodné množství analyzovaného vzorku bylo nalezeno postupným zvyšováním objemu přidávaného extraktu ke 3 ml reakční směsi. Z obrázku 16 je patrné, že při větším množství dávkovaného vzorku není závislost lineární, ale směřuje ke konstantní hodnotě úbytku absorbance. Pro měření byl použit objem 40 μl pro ABTS a 50 μl pro DPPH nacházející se v lineární části závislosti. Úbytek absorbance byl vypočítán podle následujícího vztahu:

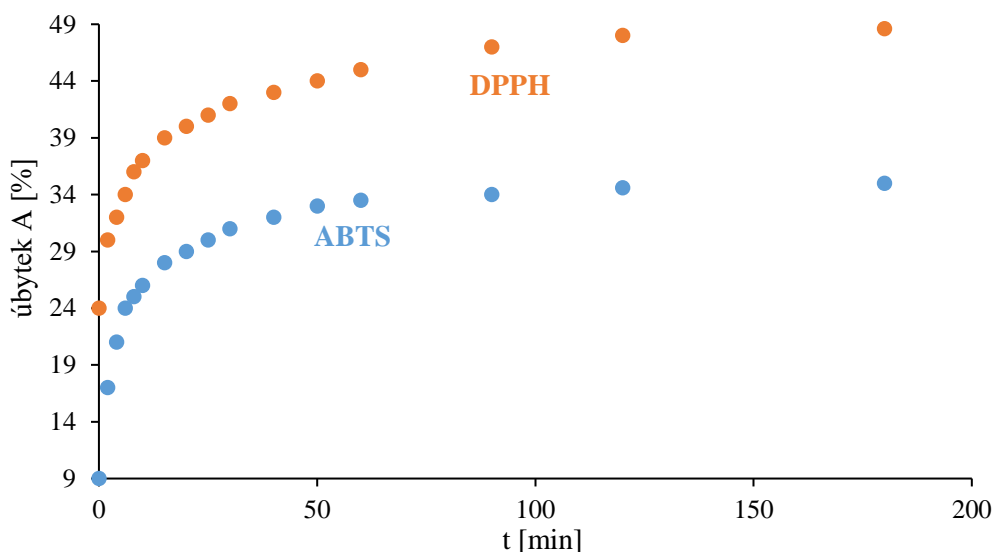
$$\text{úbytek } A (\%) = \frac{A - A_0}{A} \cdot 100$$

kde A je absorbance v čase $t = 30$ minut od začátku reakce, A_0 je počáteční absorbance v čase $t = 0$.



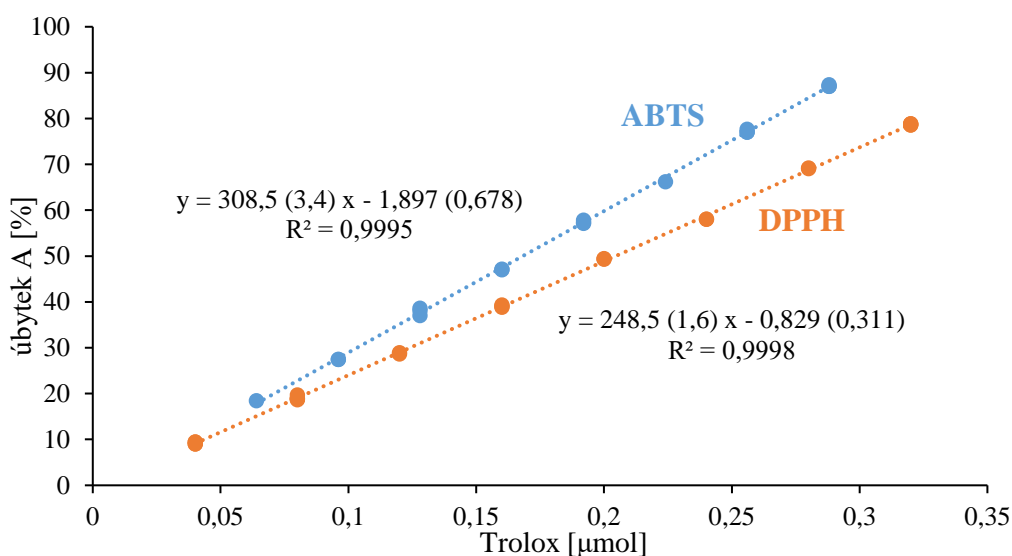
Obrázek 16: Závislost úbytku A na množství přidávaného vzorku.

U metod ABTS a DPPH byla dále sledována rychlost reakce radikálu se vzorkem. Při odpovídající vlnové délce byl měřen úbytek absorbance po 2 minutách do 10 minut, po 5 minutách do 30 minut, po 10 minutách do 60 minut a po 60 minutách do 180 minut (obrázek 17).



Obrázek 17: Úbytek absorbance v závislosti na čase.

Aby bylo možné porovnávat výsledky získané pomocí obou metod, byl u všech vzorků úbytek absorbance přepočten na ekvivalentní množství standardu Troloxu pomocí odpovídající kalibrační křivky. Kalibrační roztoky byly proměřeny třikrát na osmi koncentračních hladinách. Regresní diagnostika byla provedena v programu QC Expert (TriloByte, ČR), kde byly s pomocí grafických diagnostik odstraněny vlivné body. Významnost regresních parametrů byla testována pomocí Studentova t-testu. Parametry lineární regrese – úsek a směrnice, jsou spolu s jejich směrodatnými odchylkami a koeficientem determinace uvedeny na obrázku 18.

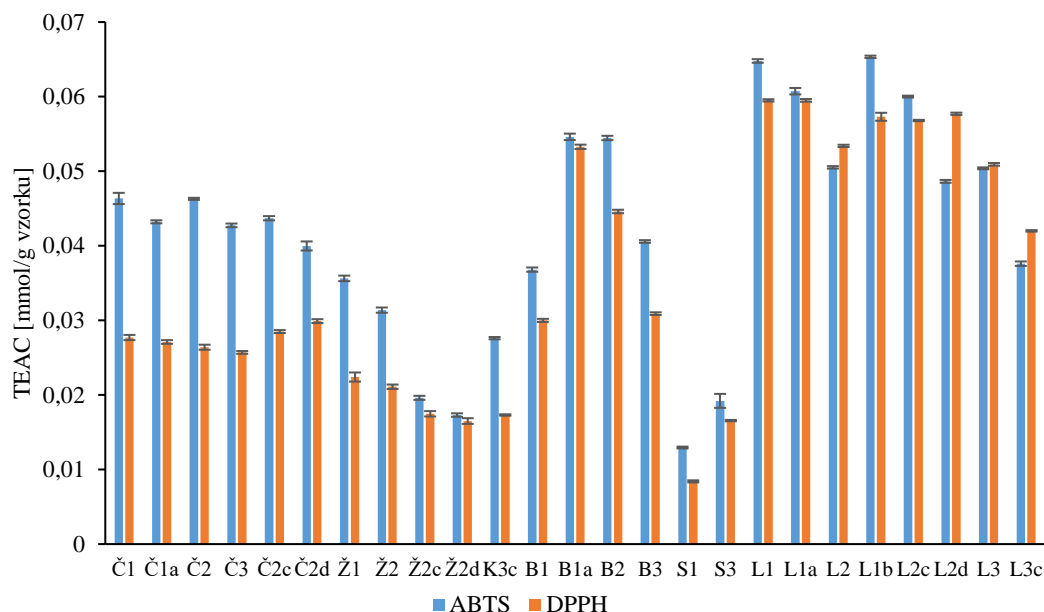


Obrázek 18: Kalibrační křivka závislosti úbytku A na množství Troloxu v dávkovaném objemu.

Pro stanovení antioxidační aktivity bylo proměřeno 25 methanolických extraktů lichořeřišnice větší. Před analýzou byl každý vzorek připraven dle postupu uvedeného v kapitole 2.3.1. Každý vzorek byl proměřen pětkrát. Výsledné hodnoty TEAC a směrodatné odchylky jsou uvedeny v příloze (tabulka P1-P2).

Jak je patrné z obrázku 19, hodnoty ABTS jsou téměř ve všech případech vyšší než hodnoty DPPH, s výjimkou listů, do kterých byla před extrakcí přidána kyselina mravenčí. Nejvyšší rozdíl mezi hodnotami získanými oběma metodami je pozorován v červených květech, nejmenší rozdíly jsou u listů. Důvodem nižších hodnot DPPH může být zřejmě jeho snížená reaktivita se všemi složkami přítomnými v extraktu.

Z výsledků stanovení je patrný výrazný rozdíl mezi antioxidační aktivitou jednotlivých částí rostliny. Tento rozdíl je způsobený odlišným zastoupením fenolických látek v každé části. Hodnoty TEAC se u červených květů pohybují v rozsahu 0,0399-0,0463 mmol/g u ABTS a u DPPH v rozsahu 0,0264-0,0299 mmol/g. U žlutých květů je to 0,0173-0,0356 mmol/g u ABTS a u DPPH 0,0165-0,0224 mmol/g. Je tedy zřejmé, že žluté květy mají nižší antioxidační aktivitu než květy červené, což je způsobené nízkou koncentrací fenolických látek a anthokyaninů. Dalším rozdílem mezi červenými a žlutými květy je vliv kyseliny mravenčí, která u žlutých květů způsobila pokles antioxidační aktivity. Úprava vzorku má na hodnotu antioxidační aktivity v červených květech minimální vliv. U bobulí se hodnoty TEAC pohybují v rozsahu 0,0368-0,0546 mmol/g u ABTS, u DPPH je to 0,0301-0,0531 mmol/g. Vysoké hodnoty antioxidační aktivity lze pozorovat konkrétně u mraženého a macerovaného vzorku bobule, zatímco u listů mražení způsobilo její mírný pokles. Listy jsou částí rostliny, která v porovnání s ostatními vykazuje nejvyšší antioxidační aktivitu, v rozmezí 0,0376-0,0654 mmol/g u ABTS, u DPPH 0,0420-0,0595 mmol/g, naopak stonek má hodnotu nejnižší, a to 0,0129-0,0192 mmol/g u ABTS a 0,0084-0,0166 mmol/g u DPPH.



Obrázek 19: Antioxidační aktivita vzorků lichořeřišnice větší (1-sušení, 2-mražení, 3-čerstvé, a-macerace, b-odlišné místo sběru, c-přídavek 0,3% FA, d-přídavek 1% FA).

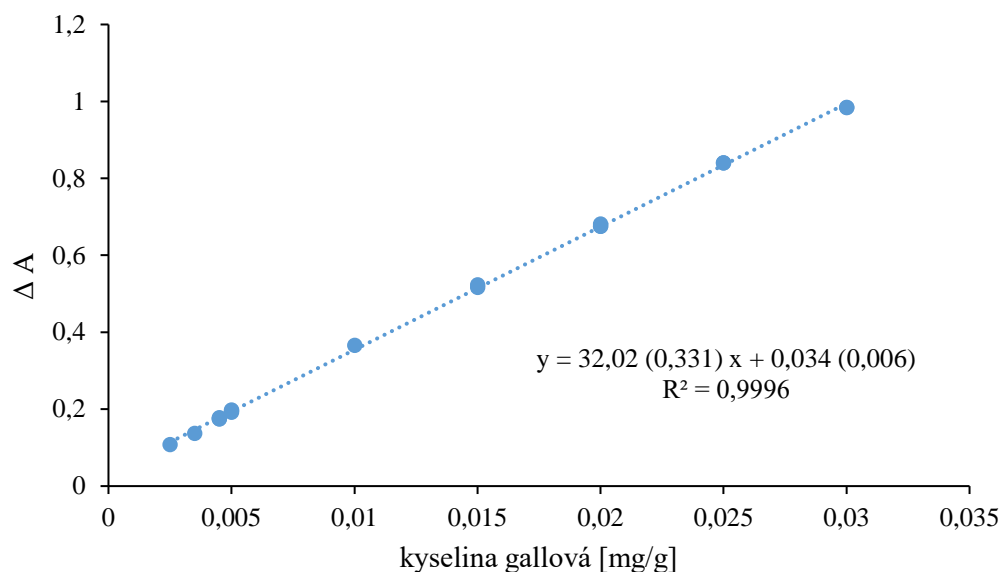
3.2 Stanovení celkového množství fenolických látek

Opět byla nejprve provedena optimalizace spočívající ve výběru vhodného objemu dávkovaného vzorku. Pro tuto metodu byl zvolen objem 50 μ l. Nárůst absorbance byl vypočítán podle následujícího vztahu:

$$\Delta A = A - A_0$$

kde A je absorbance v čase $t = 35$ min od počátku reakce a A_0 je počáteční absorbance v čase $t = 0$ min.

Byla sestrojena kalibrační křivka závislosti ΔA na koncentraci kyseliny gallové. Kalibrační roztoky byly proměřeny třikrát na devíti koncentračních hladinách. Pomocí programu QC Expert byly opět odstraněny vlivné body stejným způsobem, jako u metody ABTS a DPPH. Úsek a směrnice jsou uvedeny spolu s jejich směrodatnými odchylkami a koeficientem determinace na obrázku 20.



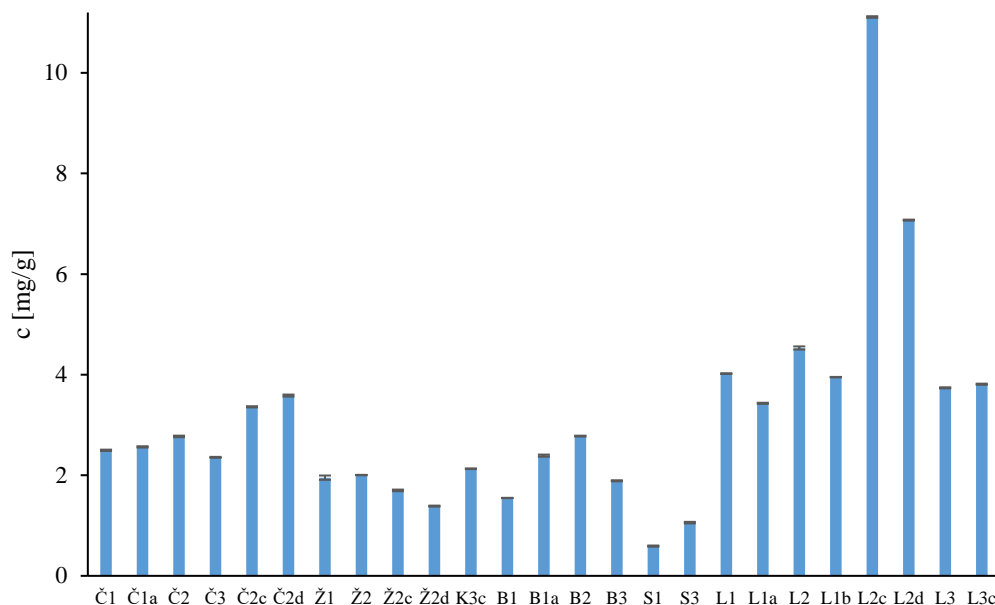
Obrázek 20: Kalibrační závislost změny A na množství kyseliny gallové.

Pro stanovení celkového množství fenolických látek bylo změřeno 25 vzorků lichořeřišnice větší. Vzorky byly připraveny dle postupu uvedeného v kapitole 2.3.1. Každý vzorek byl proměřen pětkrát. Průměrné hodnoty celkového množství fenolických látek a směrodatné odchylky jsou uvedeny v příloze (tabulka P3).

Z obrázku 21 je možné vidět, že jednotlivé části rostliny se v obsahu fenolických látek výrazně liší. Ve vzorcích mražených listů je nalezeno největší množství fenolických látek, které se po přidavku 0,3% kyseliny mravenčí zvýšilo téměř trojnásobně. Naopak u čerstvých listů můžeme po přidavku kyseliny pozorovat konstantní trend. Kyselina mravenčí může mít vliv na specifické nefenolické redukující sloučeniny obsažené ve vzorku listu, jako jsou organické kyseliny a cukry, které mohou reagovat s Folinovým činidlem a prudce tak zvýšit celkový obsah fenolických látek.

U červených květů se celkové množství fenolických látek pohybuje v rozmezí 2,49-3,58 mg/g. Největší množství obsahuje vzorek Č2d. U žlutých květů je množství v rozmezí 1,39-2,00 mg/g. Nízký obsah fenolických látek ve žlutých květech je důsledkem nízkého obsahu anthokyaninů. U bobulí, stonku a listů můžeme pozorovat vliv úpravy vzorku na celkové množství fenolických látek. Vzorek B2 obsahuje 2,78 mg/g a vzorek L2 4,53 mg/g. Oba jsou zástupci mražených vzorků. Ve stonku je obsah fenolických látek vyšší ve vzorku zpracovaném v čerstvém stavu, v porovnání se vzorkem sušeným.

Korelační závislostí byl prokázán vztah mezi metodou DPPH a FCM, což dokládá koeficient determinace $R^2 = 0,74$ a mezi metodou ABTS a FCM, kde $R^2 = 0,70$ (obrázek P1 a P2)

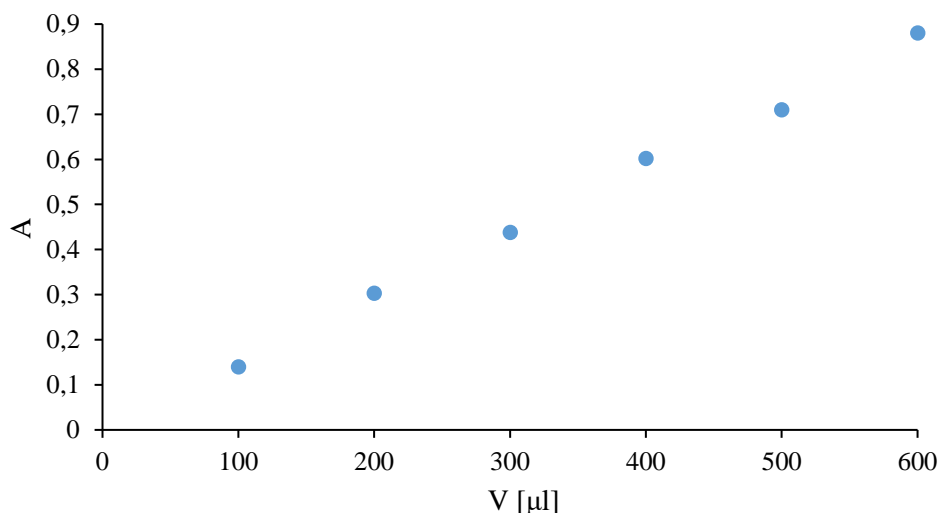


Obrázek 21: Celkové množství fenolických látek vzorků lichořeřišnice větší (1-sušení, 2-mražení, 3-čerstvé, a-macerace, b-odlišné místo sběru, c-přídavek 0,3% FA, d-přídavek 1% FA).

3.3 Stanovení celkového množství anthokyaninů pH diferenciální metodou

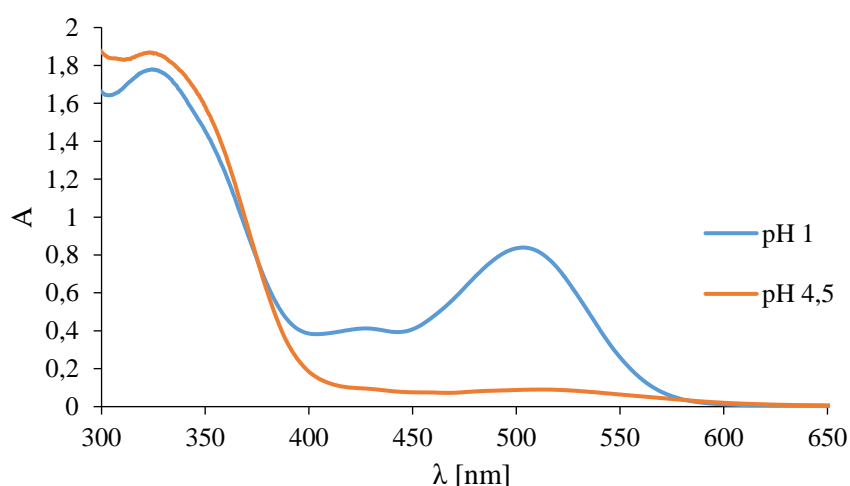
Pro tuto metodu byly připraveny dva pufrů (pH 1 a pH 4,5). Optimální množství vzorku přidávaného k pufrům bylo zvoleno postupným zvyšováním objemu tak, aby celkový objem reakční směsi byl vždy 3 ml. Byla vytvořena závislost nárůstu absorbance na množství přidávaného vzorku, z které bylo jako optimum vybráno 400 μ l (obrázek 22).

Stanovení celkového množství anthokyaninů bylo provedeno u všech extraktů, přičemž každý vzorek byl proměřen pětkrát v obou roztocích o různém pH. Postup pro výpočet celkového množství anthokyaninů je uveden v experimentální části (kapitola 2.3.2.4). Průměrné hodnoty celkového množství anthokyaninů a směrodatné odchylky jsou uvedeny v příloze (tabulka P4).

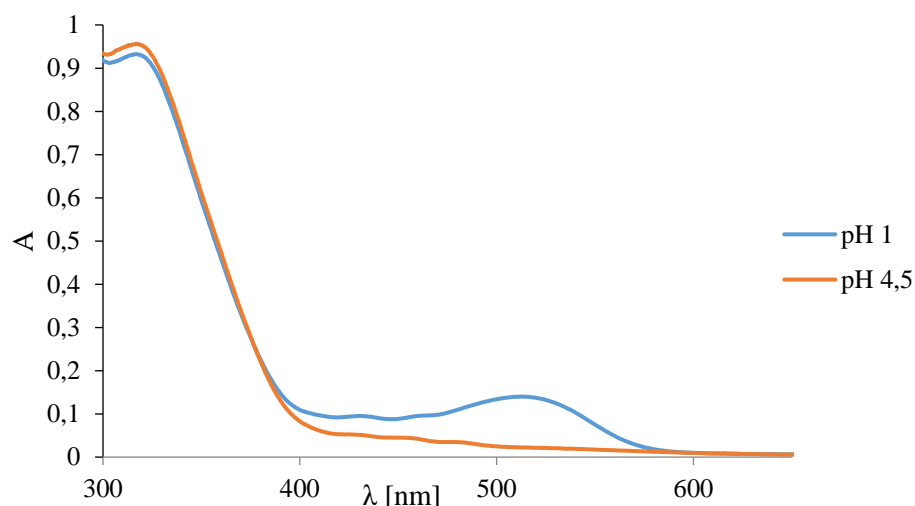


Obrázek 22: Závislost nárůstu absorpce na množství přidávaného vzorku.

U červených a žlutých květů bylo proměřeno spektrum v rozmezí vlnových délek 200-800 nm v obou roztocích pufrů. Z obrázku 23 je patrné, že absorpční maximum hlavního anthokyaninu ve vzorku červených květů se pohybuje okolo hodnoty 500 nm, u žlutých květů je jeho maximum posunuto k mírně vyšším hodnotám, což je důsledek přítomnosti jiného hlavního anthokyaninu (obrázek 24). V červených květech je hlavním anthokyaninem pelargonidin-3-glukosid s maximem absorpce při 496 nm [89], zatímco u žlutých květů je dominantní delphinidin-3-dihexosid s maximem absorpce při 534 nm [5, 9]. Pro zjednodušení je celkové množství anthokyaninů ve vzorcích lichořeřišnice vztaženo pouze na pelargonidin-3-glukosid.

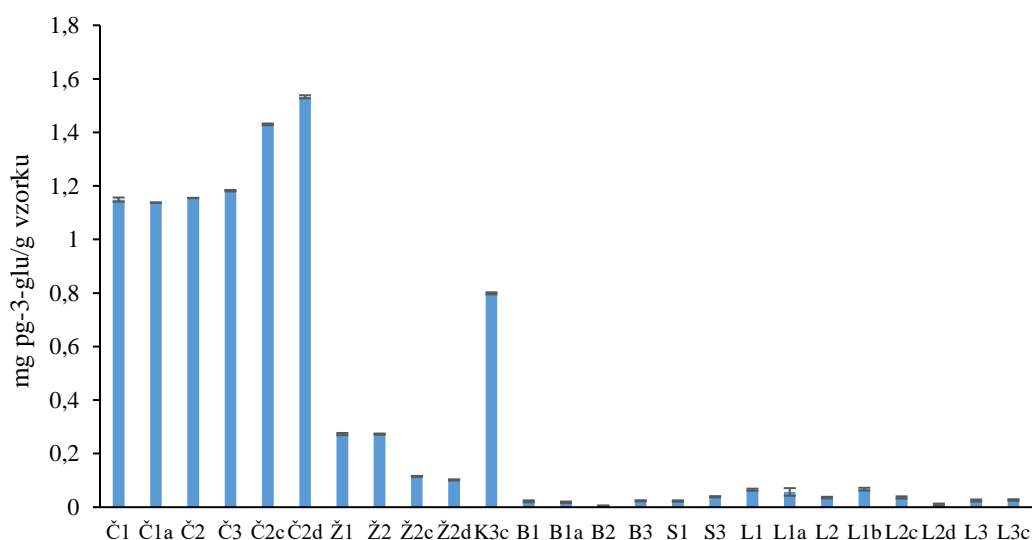


Obrázek 23: Spektrální charakteristika anthokyaninu při pH 1 a pH 4,5 ve vzorku červených květů.



Obrázek 24: Spektrální charakteristika anthokyaninu při pH 1 a pH 4,5 ve vzorku žlutých květů.

Z obrázku 25 je patrné, že největší obsah anthokyaninů je v květech rostliny, a to konkrétně v červených květech, kde se množství pohybuje v rozmezí 1,14-1,53 mg/g. Největší množství je ve vzorku Č2d, který obsahuje 1,53 mg/g. Přídavkem kyseliny mravenčí před extrakcí se množství u červených květů zvyšuje, naproti tomu u žlutých květů je pozorován jejich úbytek. Ve žlutých květech je celkový obsah v rozmezí 0,102-0,273 mg/g. Ve vzorku K3c s přídavkem kyseliny mravenčí před extrakcí je pozorován úbytek koncentrace anthokyaninů, což je důvodem pravděpodobně většího zastoupení žlutých květů ve vzorku. V ostatních částech rostliny je ve srovnání s květy množství anthokyaninů zanedbatelné.

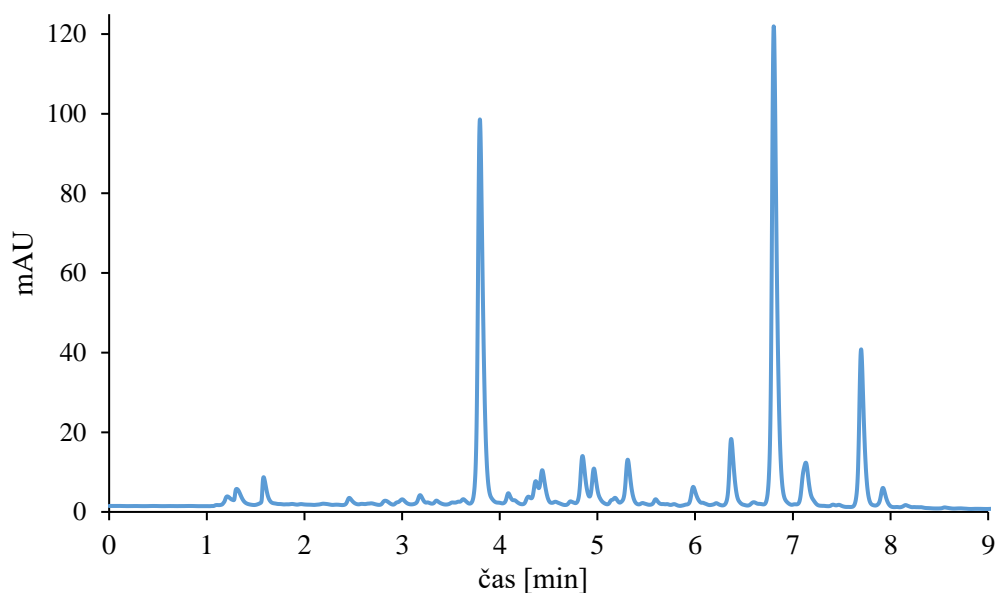


Obrázek 25: Celkový obsah anthokyaninů ve vzorcích lichořeřišnice větší (1-sušení, 2-mražení, 3-čerstvé, a-macerace, b-odlišné místo sběru, c-přídavek 0,3% FA, d-přídavek 1% FA).

3.4 Identifikace a kvantifikace fenolických látek s glukosinolátem ve vzorcích lichořeřišnice větší

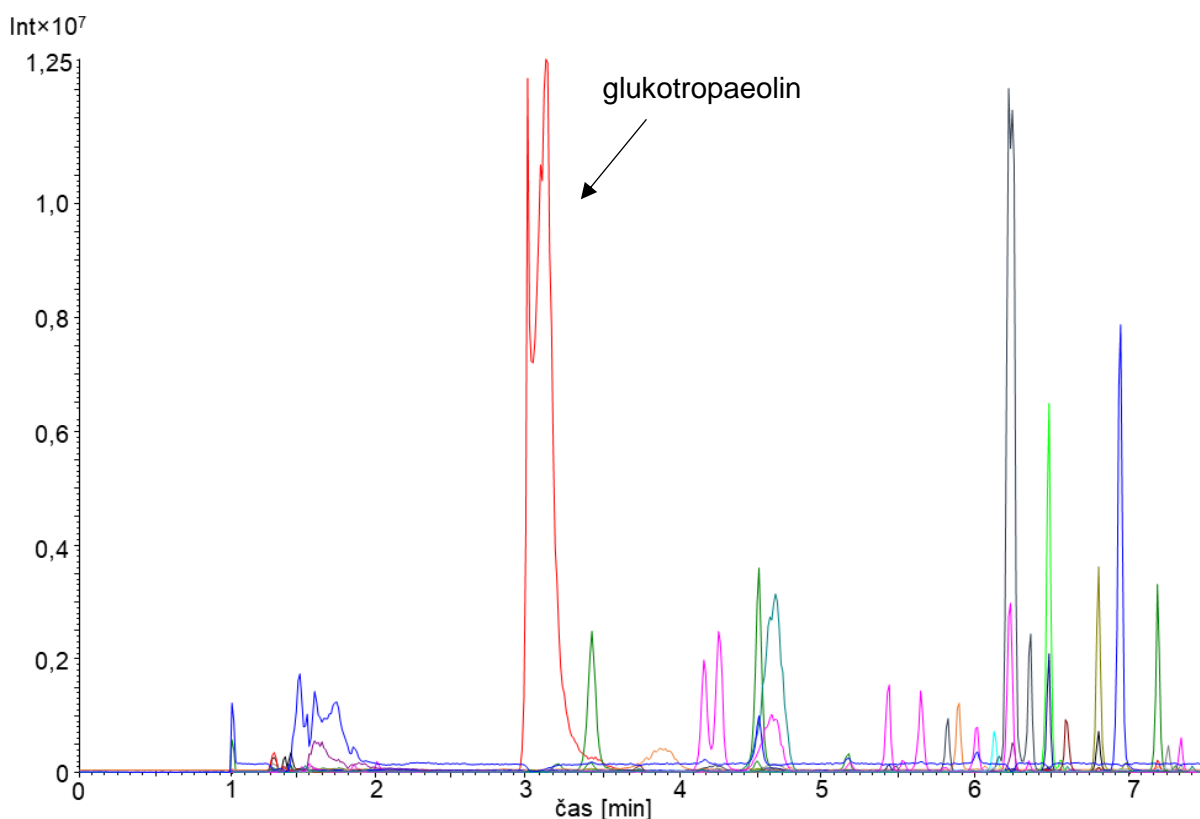
3.4.1 Optimalizace HPLC/MS

Optimalizace separace byla provedena na modelovém vzorku směsi květů, který obsahoval největší množství látek. Modelový vzorek byl naředěn deionizovanou vodou v poměru 1:1. Pro optimalizaci separace fenolických látek s glukosinolátem byly testovány celkem tři kolony. Nejprve byla vybrána klasická oktadecylsilikagelová stacionární fáze (Ascentis Express C18) a poté byly testovány kolony plněné modifikovaným oktadecylsilikagelem (Luna Omega PS a Kinetex Polar C18). Optimalizované parametry byly organická složka mobilní fáze (acetonitril, methanol), počáteční koncentrace organické složky u gradientové eluce a strmost gradientu (obrázek P3-P7). Průtok mobilní fáze, teplota kolony a nástřik vzorku se při optimalizaci neměnily. Cílem optimalizace byla separace co největšího počtu látek v nejkratším čase s co nejlepším rozlišením. Nejvhodnější byla kolona Kinetex Polar C18, která je vhodná zejména pro separaci polárních látek. S využitím mobilní fáze acetonitrilu a vody okyselené kyselinou mravenčí (0,3 %) bylo dosaženo uspokojivé separace látek obsažených v extraktu z květů z lichořeřišnice, která byla dále použita pro identifikaci látek pomocí hmotnostního spektrometru (obrázek 26).



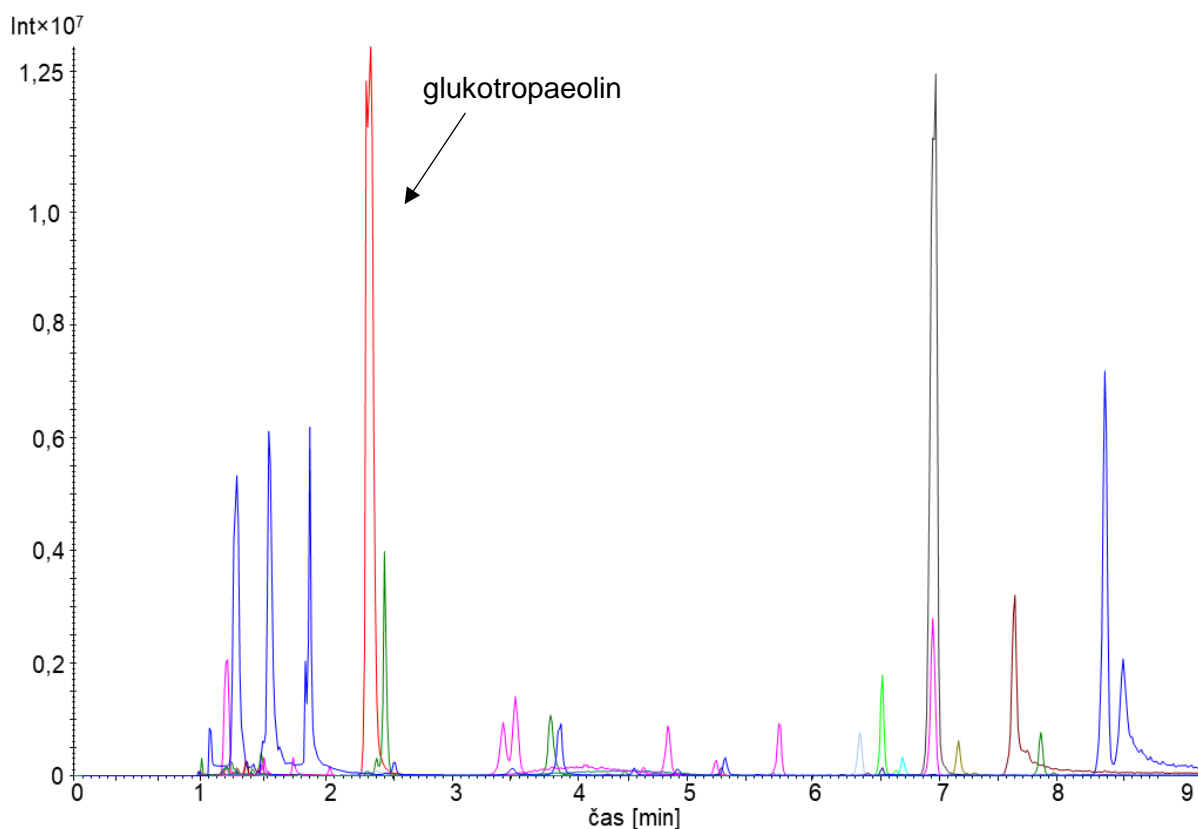
Obrázek 26: Separace látek na koloně Kinetex Polar C18 (150 × 3 mm, 2,6 μm), mobilní fáze: ACN/H₂O+HCOOH (0,3 %), gradient: 0 min-10 % ACN, 10 min-40 % ACN, průtok: 0,5 ml/min, teplota kolony: 30°C, dávkování: 2 μl, detekce: 280 nm

Pro identifikaci látek obsažených v extraktech z různých částí lichořeřišnice byl použit hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólem jako analyzátozem. Nejprve byly zjištěny protonované, $[M+H]^+$, a deprotonované ionty, $[M-H]^-$, při snímání kladných a záporných iontů v režimu Q1 (skenování prvním kvadrupólem). Dále byla provedena MS/MS analýza pro zjištění fragmentace látek a odhalení jejich struktury. Pro identifikované látky byla mírně upravena separace se snahou o kratší čas analýzy za zachování stejného rozlišení jednotlivých látek. Příklady testovaných gradientů jsou v příloze (obrázek P8-P11). Výsledný gradient je uvedený v experimentální části (kapitola 2.3.3). Čas separace byl z původních 9 minut zkrácen na 7,5 minut. Snaha o dosažení ještě rychlejší separace byla neúspěšná, jelikož došlo ke koeluci velkého množství látek s glukotropaeolinem a k jejich vzájemnému ovlivnění (obrázek P10). Posledním optimalizovaným parametrem bylo množství kyseliny mravenčí přidané do vodné složky mobilní fáze, které má velký vliv na průběh separace fenolických látek. Separace byla provedena při pH vody 2,3; 2,4 a 2,5. Přídavek kyseliny mravenčí na pH 2,5 byl dostačující a snižováním hodnoty pH se rozlišení ani účinnost ionizace příliš neměnila, proto byla tato hodnota pH zvolena jako optimální (obrázek 27).



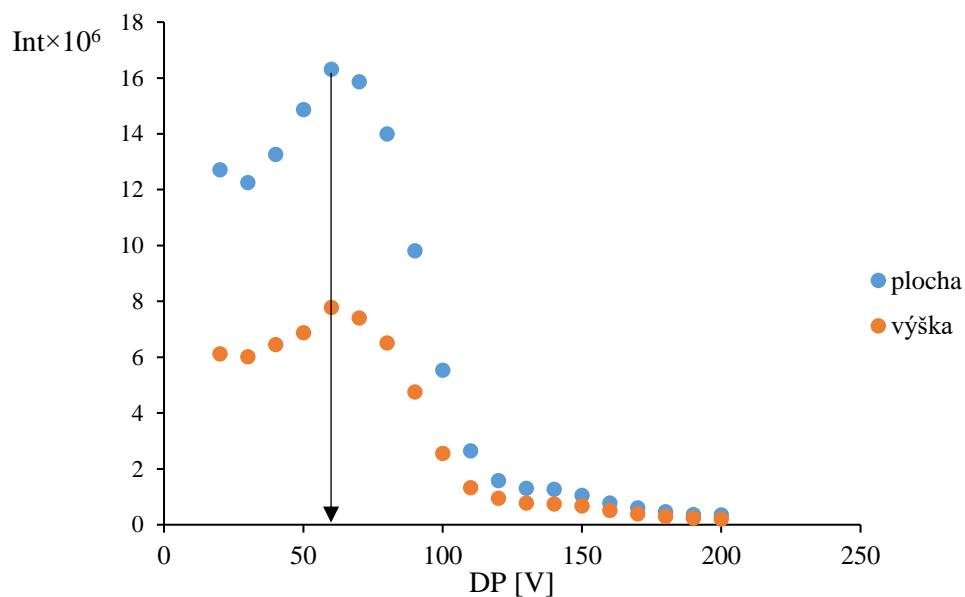
Obrázek 27: Separace látek na koloně **Kinetex Polar C18** (150 × 3 mm, 2,6 μm), mobilní fáze: ACN/H₂O (pH 2,5), gradient: 0 min-10 % ACN, 3 min-20 % ACN, 5 min-36 % ACN, 6 min-50 % ACN, 7 min-10 % ACN, průtok: 0,5 ml/min, teplota kolony: 30°C, dávkování: 2 μl, detekce: ESI/SIM.

Dále byla sledována ionizační účinnost monitorovaných látek při použití acetonitrilu a methanolu jako organické složky mobilní fáze. Za použití methanolu byla ionizační účinnost mírně vyšší, ale značně se projevilo chvostování píků, zejména u glukotropaeolinu, proto byl jako organická složka mobilní fáze vybrán acetonitril. Jak je patrné z obrázku 27, i přes optimalizaci separačních podmínek byl pík glukotropaeolinu rozštěpený a stále chvostoval. Z toho důvodu byl do mobilní fáze přidán 5 mM mravenčan amonný, který se projevil jako vhodné ion-párové činidlo a poskytl zlepšení tvaru píku glukotropaeolinu (obrázek 28). Jeho použití se však nepříznivě projevilo na ostatních látkách, jejichž ionizační účinnost byla výrazně potlačena. Proto bylo do roztoku mravenčanu amonného přidáno 50 μ l kyseliny mravenčí, avšak ke zlepšení nedošlo. Mobilní fáze byla opět změněna na acetonitril a vodu s kyselinou mravenčí (pH 2,5) a až následnou optimalizací parametrů pro hmotnostně spektrometrickou detekci došlo k vyřešení problému.



Obrázek 28: Separace látek na koloně **Kinetex Polar C18** (150×3 mm, $2,6 \mu\text{m}$), mobilní fáze: ACN/ HCOONH_4 (5mM), gradient: 0 min-10 % ACN, 10 min-40 % ACN, 11 min-70 % ACN, 12 min-10 % ACN, průtok: 0,5 ml/min, teplota kolony: 30°C , dávkování: 2 μ l, detekce: ESI/SIM.

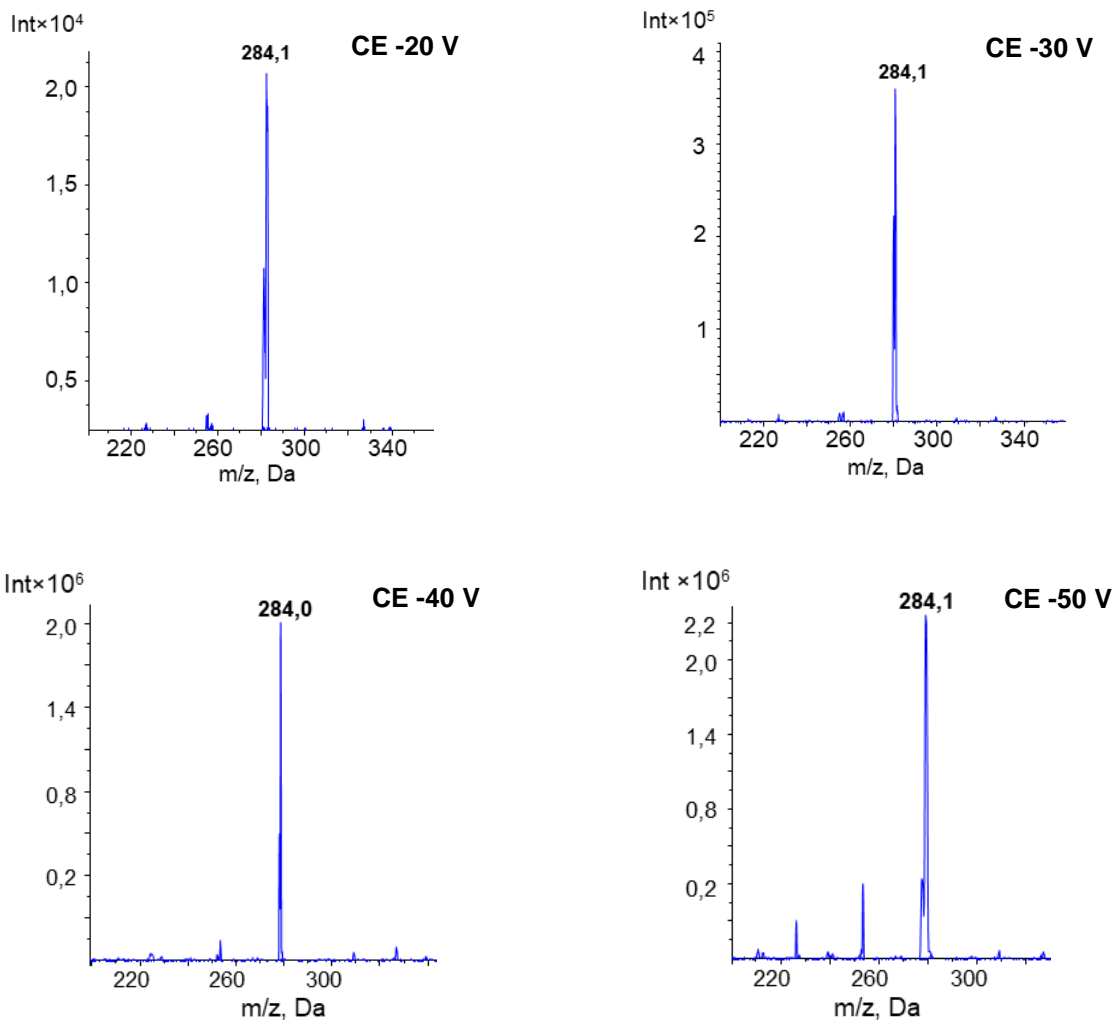
Optimalizace detekce pro separaci vybraných látek byla provedena s využitím hmotnostního spektrometru Q-TRAP. Prvním parametrem, který byl optimalizován, byl deklasterační potenciál (DP). Deklasterační potenciál byl měněn od hodnoty -20 do -200 V. Následně byl vytvořen graf závislosti plochy nebo výšky látky na hodnotě DP (obrázek 29). Jako optimum byla vybrána hodnota deklasteračního potenciálu, při níž byla plocha a výška píku sledované látky největší.



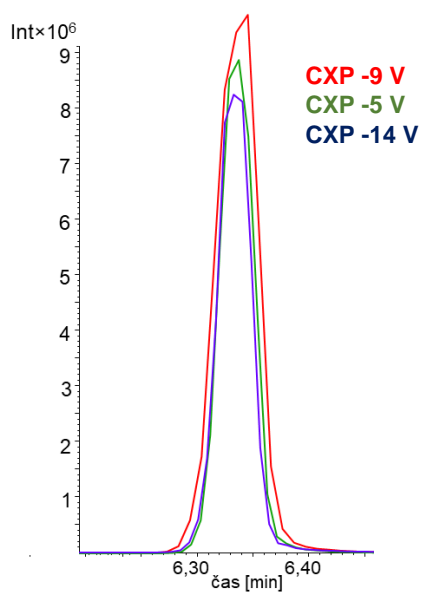
Obrázek 29: Optimalizace deklasteračního potenciálu pro m/z 549 (derivát kvercetinu).

Po deklasteračním potenciálu byla optimalizována kolizní energie. Kolizní energie byla měřena od -50 do -20 V. Byla sledována jak intenzita produktového iontu, tak intenzita jeho hlavních fragmentů (obrázek 30). Pro látky, u nichž byla tendence dosahovat maxima intenzity pro hodnotu kolizní energie větší než -20 a menší než -50 byla kolizní energie ještě změřena v rozsahu od -20 do -12 V a od -58 do -50 V. Posledním optimalizovaným parametrem bylo CXP, které bylo měřeno v rozsahu od -14 do -5 V (obrázek 31).

Následně byly jednotlivé parametry MRM přechodů optimalizovány u látek s dostupnými standardy pomocí přímé infúze do hmotnostního spektrometru. Pro každou látku byl optimalizován a vybrán jeden MRM přechod. Optimalizované parametry všech látek jsou uvedeny v tabulce 5.



Obrázek 30: Optimalizace kolizní energie pro m/z 609 (derivát kaempferolu).



Obrázek 31: Optimalizace CXP pro MRM přechod m/z 609-284 (derivát kaempferolu), CE=-50 V, DP= -120 V.

Tabulka 5: Optimalizované parametry pro MS analýzu.

Látka	Značení	Q1 m/z	Q3 m/z	čas [min]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
k. chinová	1	191	85	1,63	-85	-30	-7
derivát k. chinové	2	191	111	1,71	-35	-16	-8
derivát k. chinové	3	191	111	1,94	-35	-16	-8
glukotropaeolin	4	408	97	3,24	-100	-50	-6
k. kaffeoylchinová	5	353	191	3,4	-70	-30	-7
k. neochlorogenová	6	353	179	3,57	-75	-28	-5
k. kumaroylchinová	7	337	163	4,27	-65	-20	-14
k. kumaroylchinová	8	337	163	4,36	-65	-20	-14
k. chlorogenová	9	353	191	4,62	-70	-30	-7
k. 4-hydroxybenzoová	10	137	93	4,7	-55	-24	-7
k. kaffeoylchinová	11	353	191	5,23	-70	-30	-7
k. kumaroylchinová	12	337	173	5,24	-60	-20	-14
k. kávová	13	179	135	5,3	-65	-22	-7
derivát kvercetinu	14	595	253,1	5,45	-130	-36	-7
derivát kaempferolu	15	611	269	5,49	-130	-32	-9
k. kumaroylchinová	16	337	173	5,6	-60	-20	-14
k. kumaroylchinová	17	337	191	5,72	-65	-20	-14
derivát kvercetinu	18	625	300	5,97	-150	-48	-10
k. kumaroylchinová	19	337	191	6,09	-65	-20	-14
derivát kvercetinu	20	563	479	6,21	-70	-22	-5
myricetin hexosid	21	479	317	6,22	-110	-40	-11
derivát kvercetinu	22	711	300	6,26	-60	-54	-5
derivát kaempferolu	23	609	284	6,32	-120	-50	-9
derivát kaempferolu	24	611	285	6,33	-130	-50	-5
derivát kaempferolu	25	695	284	6,59	-70	-54	-9
derivát kaempferolu	26	651	284	6,6	-135	-50	-5
derivát kaempferolu	27	651	284	6,69	-135	-50	-5
isokvercitrin	28	463	300	6,72	-120	-38	-5
kaempferol-rutinosid	29	593	285	6,8	-155	-42	-9
derivát kvercetinu	30	563	505	6,9	-100	-30	-12
derivát kvercetinu	31	549	505	6,93	-60	-18	-5
k. <i>o</i> -kumarová	32	163	119	7	-50	-20	-9
derivát kvercetinu	33	563	277	7,06	-100	-34	-6
astragalin	34	447	284	7,1	-110	-38	-5
derivát kvercetinu	35	549	505	7,13	-60	-18	-5
derivát kvercetinu	36	563	341	7,15	-100	-30	-5
derivát kaempferolu	37	533	489	7,34	-50	-18	-5
derivát kvercetinu	38	519	315	7,41	-100	-18	-5
k. <i>p</i> -kumarová	39	163	119	7,54	-50	-20	-9

Hlavní fenolické sloučeniny detekované v methanolických extraktech různých částí lichořeřišnice větší (obrázky 32-36) byly identifikovány jako glykosidy flavonolů (nejčastěji kvercetin a kaempferol) a deriváty kyselin kaffeoylchinové a kumaroylchinové. Jak je patrné z obrázků 32-36, zastoupení monitorovaných fenolických látek se značně liší v závislosti na části rostliny.

Derivátům kaffeoylchinové a kumaroylchinové kyseliny odpovídají píky s označením 5-9, 11, 12, 16, 17 a 19, jejichž deprotonované molekuly mají m/z 353 (kaffeoylchinová kyselina) a m/z 337 (kumaroylchinová kyselina). Na základě informací z fragmentačních spekter bylo potvrzeno, že se jedná o izomerní formy těchto kyselin, což je v souladu s již prezentovanými výsledky [55]. Identifikace látek 9 a 6 byla potvrzena pomocí dostupných standardů, jedná se o kyseliny chlorogenovou a neochlorogenovou. Další deriváty kaffeoylchinové kyseliny jsou jejich izomery. Na základě informací z literatury [9, 55] obsahuje lichořeřišnice 3-O-p-kumaroylchinovou kyselinu ve formě cis a trans a 5-O-p-kumaroylchinovou kyselinu opět ve formě cis a trans. Celkem dosud byly identifikovány čtyři deriváty této kyseliny. Při analýze námi připravených extraktů bylo identifikováno 6 derivátů/izomerů. Zbýlé dva deriváty v literatuře prozatím uvedeny nebyly. Námi dostupnou instrumentální technikou však přesná identifikace těchto derivátů není možná.

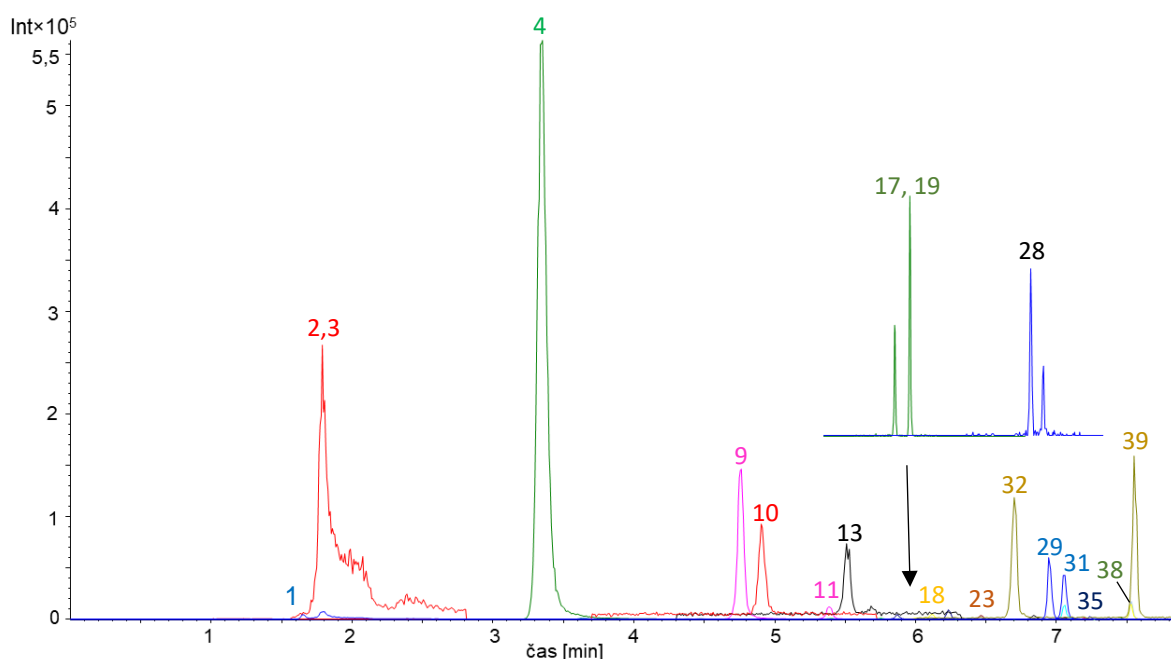
V methanolických extraktech byly identifikovány i anthokyaniny, a to konkrétně pelargonidin-3-sophorosid, dephinidin-3-dihexosid a cyanidin-3-sophorosid [5, 9]. Pro separaci anthokyaninů však nebyly vhodné podmínky a z toho důvodu dále nebyly monitorovány.

Látka s označením 21 je zástupce myricetinu s m/z 479 a produktovým iontem o m/z 317. Ztráta 162 z aglykonu je typická pro štěpení hexoskupiny. Látka byla tedy identifikována jako myricetin hexosid [9]. V literatuře [9] jsou uvedeny ještě další dva deriváty myricetinu, které se vyskytují v květech rostliny, a to myricetin dihexosid a myricetin acetyl dihexosid, ani jeden z těchto derivátů pozorován nebyl.

Na základě fragmentačních spekter byly látky s označením 14, 18, 20, 22, 28, 30, 31, 33, 35, 36 a 38 identifikovány jako deriváty kvercetin. Srovnáním se standardem byla identifikována látka 28 jako isokvercitrin. Látka 18 s m/z 625 a produktovým iontem m/z 300 byla identifikována jako kvercetin dihexosidu na základě neutrální ztráty 325, typické pro dihexosidovou skupinu [9]. U látky 14, m/z 595, byla ve fragmentačním spektru pozorována ztráta typická pro sophorosu. U látky 38 (MRM přechod 519-315) je možné pozorovat ztrátu acetylhexosidu [9]. V dostupných publikacích [2, 9, 55, 78] jsou uvedeny nejvýše čtyři

deriváty kvercetinu, zatímco v této diplomové práci jich bylo nalezeno jedenáct. Jak již bylo zmíněno, přesná identifikace není z důvodu použité instrumentace možná.

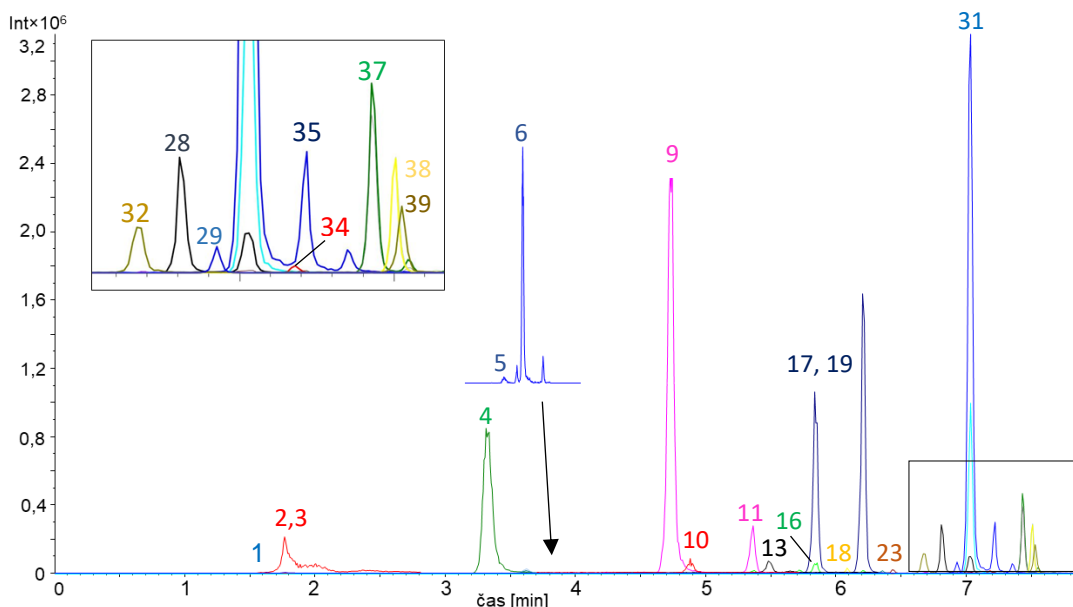
Látky s označením 15, 23-27, 34 a 37 byly na základě přítomného produktového iontu m/z 285 identifikovány jako deriváty kaempferolu. U látky 34 byla identifikace potvrzena srovnáním se standardem, jedná se o astragalin. U ostatních látek byla identifikace provedena na základě fragmentačního chování a dostupné literatury [9, 55] - látka 15 s m/z 611 odpovídá kaempferol-sophorosidu, látka 23 s m/z kaempferol-acetyl sophorosidu, látka 25 s m/z 611 kaempferol dihexosidu, látky 26 a 27 s m/z 651 kaempferol acetyl hexosidu.



Obrázek 32: Optimalizovaná separace látek ve vzorku bobule

(1- kys. chinová, 2, 3-deriváty kys. chinové, 4-glukotropaeolin, 9-kys. chlorogenová, 10-kys. 4-hydroxybenzoová, 11-kys. kaffeoylchinová, 13-kys. kávová, 17, 19-kys. kumaroylchinová, 18-derivát kvercetinu, 23- derivát kaempferolu, 28-isokvercitrin, 29-kaempferol-rutinosid, 31-derivát kvercetinu, 32-kys. *o*-kumarová, 35, 38-derivát kvercetinu, 39-kys. *p*-kumarová)

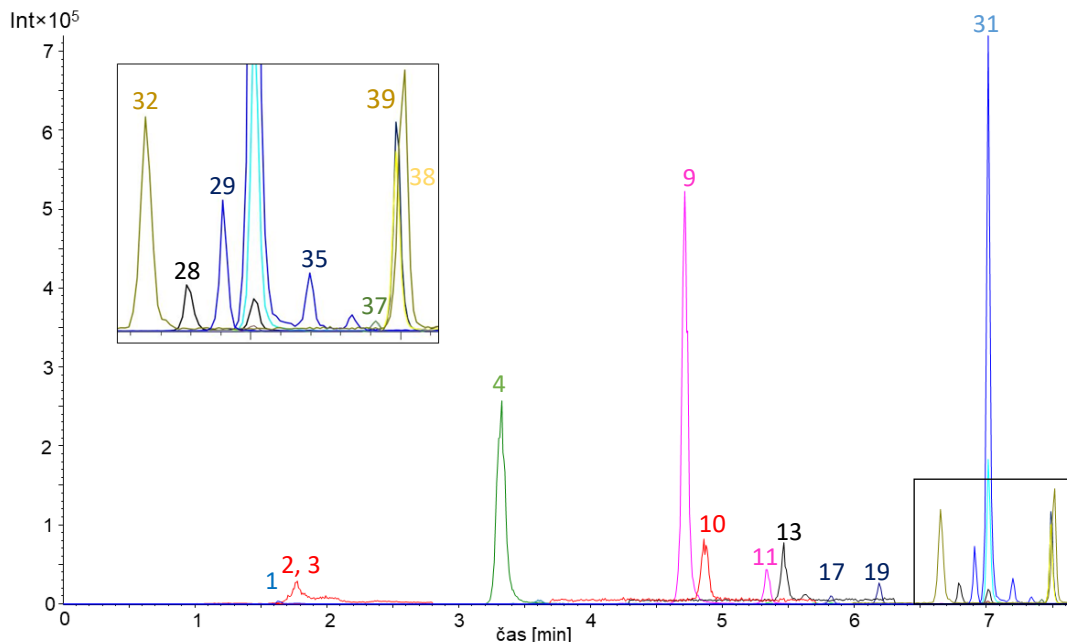
Kolona Kinetex Polar C18 (150 × 3 mm, 2,6 μm), mobilní fáze: ACN/H₂O (pH 2,5), gradient: 0 min-10 % ACN, 3 min-20 % ACN, 5 min-36 % ACN, 6 min-50 % ACN, 7 min-10 % ACN, průtok: 0,5 ml/min, teplota kolony: 30°C, dávkování: 2 μl, detekce: ESI/SIM.



Obrázek 33: Optimalizovaná separace látek ve vzorku listu

(1-k. chinová, 2,3-deriváty k. chinové, 4-glukotropaeolin, 5-k. kaffeoylkumarová, 6-k. neochlorogenová, 9-chlorogenová, 10-k. 4-hydroxybenzoová, 11-k. kaffeoylkumarová, 13-k. kávová, 16, 17, 19-k. kumaroylchinová, 18-derivát kvercetinu, 23-derivát kaempferolu, 28-isokvercitrin, 29-kaempferol-rutinosid, 31-derivát kvercetinu, 32-k. *o*-kumarová, 34-astragalin, 35-derivát kvercetinu, 37-derivát kaempferolu, 38-derivát kvercetinu, 39-k. *p*-kumarová)

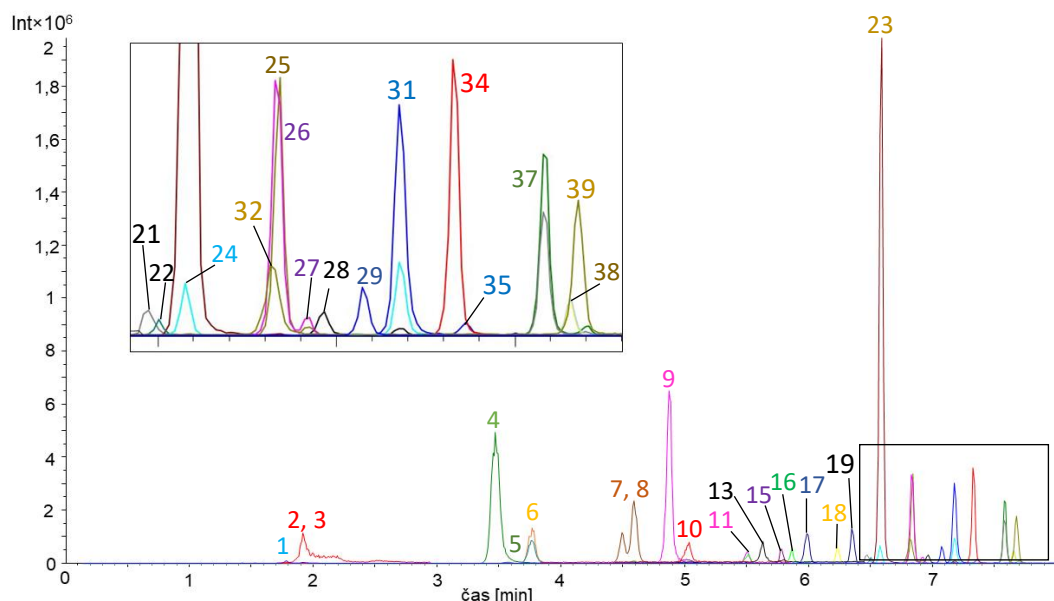
Kolona Kinetex Polar C18 (150 × 3 mm, 2,6 μm), mobilní fáze: ACN/H₂O (pH 2,5), gradient: 0 min-10 % ACN, 3 min-20 % ACN, 5 min-36 % ACN, 6 min-50 % ACN, 7 min-10 % ACN, průtok: 0,5 ml/min, teplota kolony: 30°C, dávkování: 2 μl, detekce: ESI/SIM.



Obrázek 34: Optimalizovaná separace látek ve vzorku stonku

(1-k. chinová, 2,3-deriváty k. chinové, 4-glukotropaeolin, 9-k. chlorogenová, 10-k. 4-hydroxybenzoová, 11-k. kaffeoylchinová, 13-k. kávová, 17, 19-k. kumaroylchinová, 28-isokvercitrin, 29-kaempferol-rutinosid, 31-derivát kvercetinu, 32-k. *o*-kumarová, 35-derivát kvercetinu, 37-derivát kaempferolu, 38-derivát kvercetinu, 39-k. *p*-kumarová)

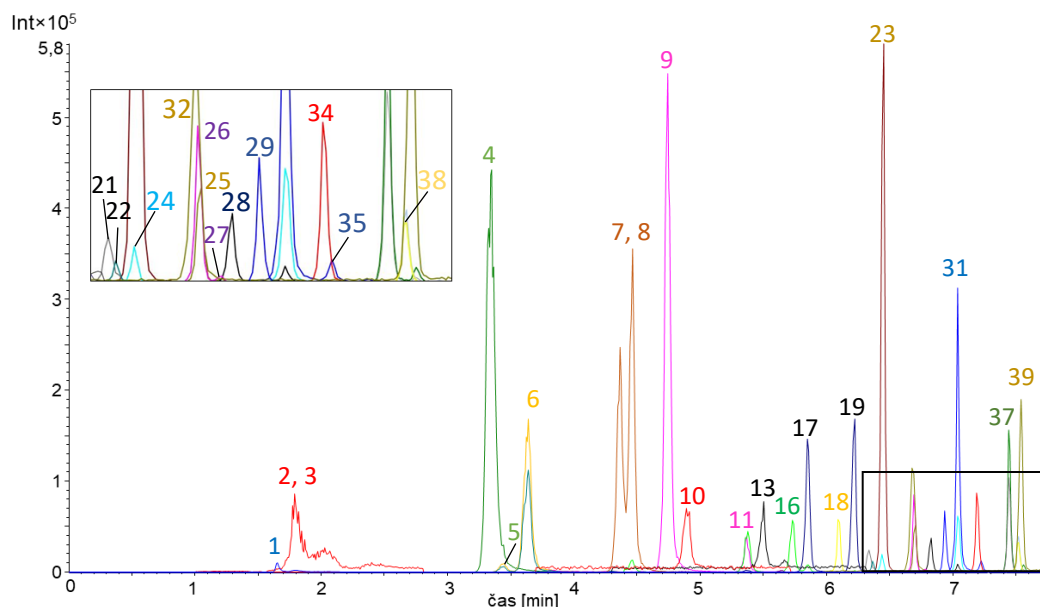
Kolona Kinetex Polar C18 (150 × 3 mm, 2,6 μm), mobilní fáze: ACN/H₂O (pH 2,5), gradient: 0 min-10 % ACN, 3 min-20 % ACN, 5 min-36 % ACN, 6 min-50 % ACN, 7 min-10 % ACN, průtok: 0,5 ml/min, teplota kolony: 30°C, dávkování: 2 μl, detekce: ESI/SIM.



Obrázek 35: Optimalizovaná separace látek ve vzorku červených květů

(1-k. chinová, 2,3-deriváty k. chinové, 4-glukotropaeolin, 5-k. kaffeoylchinová, 6-k. neochlorogenová, 7,8-k. kumaroylchinová, 9-k. chlorogenová, 10-k. 4-hydroxybenzoová, 11-k. kaffeoylchinová, 13-k. kávová, 15-derivát kaempferolu, 16, 17, 19-k. kumaroylchinová, 18-derivát kvercetinu, 21-myricetin hexosid, 22-derivát kvercetinu, 23, 24, 25, 26, 27-derivát kaempferolu, 28-isokvercitrin, 29-kaempferol- rutinosid, 31-derivát kvercetinu, 32-k. *o*-kumarová, 34-astragalin, 35-derivát kvercetinu, 37-derivát kaempferolu, 38-derivát kvercetinu, 39-k. *p*-kumarová)

Kolona Kinetex Polar C18 (150 × 3 mm, 2,6 μm), mobilní fáze: ACN/H₂O (pH 2,5), gradient: 0 min-10 % ACN, 3 min-20 % ACN, 5 min-36 % ACN, 6 min-50 % ACN, 7 min-10 % ACN, průtok: 0,5 ml/min, teplota kolony: 30°C, dávkování: 2 μl, detekce: ESI/SIM.



Obrázek 36: Optimalizovaná separace látek ve vzorku žlutých květů

(1-k. chinová, 2,3-deriváty k. chinové, 4-glukotropaeolin, 5-k. kaffeoylchinová, 6-k. neochlorogenová, 7,8-k. kumaroylchinová, 9-k. chlorogenová, 11-k. kaffeoylchinová, 10-k. 4-hydroxybenzoová, 13-k. kávová, 16, 17, 19-k. kumaroylchinová, 18-derivát kvercetinu, 21-myricetin hexosid, 22-derivát kvercetinu, 23-derivát kaempferolu, 23, 24, 25, 26, 27-derivát kaempferolu, 28-isokvercitrin, 29-kaempferol- rutinosid, 31-derivát kvercetinu, 32-k. *o*-kumarová, 34-astragalin, 35-derivát kvercetinu, 37-derivát kaempferolu, 38-derivát kvercetinu, 39-k. *p*-kumarová)

Kolona Kinetex Polar C18 (150 × 3 mm, 2,6 μm), mobilní fáze: ACN/H₂O (pH 2,5), gradient: 0 min-10 % ACN, 3 min-20 % ACN, 5 min-36 % ACN, 6 min-50 % ACN, 7 min-10 % ACN, průtok: 0,5 ml/min, teplota kolony: 30°C, dávkování: 2 μl, detekce: ESI/SIM.

3.4.2 Kvantifikace fenolických látek a glukosinolátu

Kvantitativní stanovení bylo provedeno metodou kalibrační křivky. Kalibrační roztoky byly proměřeny třikrát na devíti koncentračních hladinách. Koncentrační rozmezí jednotlivých standardů jsou uvedena v tabulce 2. Regresní diagnostika byla provedena v programu QC Expert 2.9 (TriloByte, ČR). Nejprve byla provedena kritika dat a následně bylo využito grafických diagnostik (Pregibonův graf, Williamsův graf, L-R graf, Jackknife rezidua a McCulloh-Meterův) na odhalení a odstranění vlivných bodů. Poté byla provedena kritika metody a modelu na hladině významnosti 95 %. Významnost regresních parametrů byla testována pomocí Studentova t-testu. Regresní parametry se směrodatnými odchylkami a koeficient determinace jsou uvedeny v tabulce 6. Meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ) byly stanoveny jako trojnásobek, resp. desetinásobek odstupu signálu od šumu.

Tabulka 6: Regresní parametry, meze detekce a meze stanovitelnosti pro jednotlivé látky.

Látka	LOD [ng/ml]	LOQ [ng/ml]	Směrnice	Úsek	R ²
kyselina chinová	2,16	7,2	524259±5704	18745±4692	0,9995
glukotropaeolin	3,86	12,8	284128±4058	179153±42122	0,9994
kyselina chlorogenová	1,59	5,3	1930057±7024	N, P=0,39	0,9999
astragalin	0,40	1,3	1041278±7580	41645±14834	0,9997
isokvercitrin	0,69	2,3	921907±8916	46681±20678	0,9995

Fenolické látky s glukosinolátem byly kvantifikovány s využitím kalibračních závislostí v jednotlivých extraktech připravených z různých částí lichořeřišnice větší. Byla sledována různá úprava vzorku rostliny před skladováním a vliv extrakce na obsah fenolických látek a glukosinolátu. Postup přípravy jednotlivých extraktů je uveden v experimentální části v kapitole 2.3.1. Extrakty byly zředěny v poměru 1:10 a proměřeny optimalizovanou HPLC/MS/MS metodou celkem třikrát. Obsah jednotlivých látek u sušených vzorků je v tabulce 7, ostatní vzorky jsou uvedeny v příloze (tabulky P5-P8). Výsledky jsou uvedeny v µg/g čerstvého materiálu. Jednotlivé části byly po utržení naváženy a ihned zpracovány nebo usušeny či zmraženy, protože obsah vody byl v různých částech rostliny různý a velice rychle se měnil. Množství vody hraje významnou roli při porovnání jednotlivých částí rostliny. U listů obsah vody zaujímal zhruba 85 %, u květů 91 %, u bobulí 87 % a u stonku 91 %.

Tabulka 7: Zastoupení jednotlivých látek v sušených vzorcích, koncentrace µg/g.

LÁTKA*	ČÍSLO	VZOREK					
		B1	L1	L1b	S1	Č1	Ž1
kyselina chinová	1	1,79	2,25	3,12	1,37	3,23	5,35
derivát kyseliny chinové	2	223,4	188,5	206,8	19,76	97,88	92,30
derivát kyseliny chinové	3	50,28	66,32	69,93	5,63	37,34	50,04
glukotropaeolin	4	638,1	1294,2	1184,4	241,3	729,2	809,7
kyselina kaffeoylchinová	5	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD	1,00	2,19
kyselina neochlorogenová	6	<LOD	3,81	1,46	<LOQ	26,50	44,23
kyselina kumaroylchinová	7	<LOD	0,69	0,51	<LOQ	17,63	47,86
kyselina kumaroylchinová	8	<LOQ	0,65	0,66	<LOQ	36,37	61,75
kyselina chlorogenová	9	18,65	403,6	459,5	60,73	100,1	114
kyselina kaffeoylchinová	11	1,39	34,59	30,11	4,97	5,57	7,07
kyselina kumaroylchinová	12	<LOD	2,13	3,13	<LOD	4,65	9,39
derivát kvercetinu	14	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	2,37	0,31
derivát kaempferolu	15	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	11,83	0,68
kyselina kumaroylchinová	16	<LOD	2,18	3,79	<LOD	5,68	10,26
kyselina kumaroylchinová	17	<LOQ	135,9	307,9	1,19	16,86	23,73
derivát kvercetinu	18	1,050	5,29	11,37	0,73	14,12	17,44
kyselina kumaroylchinová	19	0,850	174,4	326,2	2,33	14,99	27,55
derivát kvercetinu	20	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,21	<LOQ
myricetin hexosid	21	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	8,93	9,53
derivát kvercetinu	22	<LOQ	3,13	10,08	<LOQ	3,87	2,64
derivát kaempferolu	23	0,62	3,69	0,94	0,23	411,5	150,5
derivát kaempferolu	24	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD	12,11	4,44
derivát kaempferolu	25	<LOD	0,49	0,39	<LOD	58,79	13,06
derivát kaempferolu	26	<LOQ	0,69	0,55	<LOD	74,37	18,13
derivát kaempferolu	27	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	4,11	0,87
isokvercitrin	28	0,84	55,16	53,36	4,87	8,02	10,93
derivát kvercetinu	30	<LOQ	1,93	2,15	0,61	0,48	0,48
derivát kvercetinu	31	9,02	805,9	870,7	112,3	85,67	81,14
derivát kvercetinu	33	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,35	<LOQ
astragalín	34	<LOQ	3,17	3,31	0,10	61,48	21,03
derivát kvercetinu	35	0,44	61,54	61,39	5,83	4,03	3,83
derivát kvercetinu	36	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
derivát kaempferolu	37	<LOQ	83,44	104,7	0,92	51,12	35,94
derivát kvercetinu	38	2,69	48,98	52,63	16,67	9,70	10,89

*Deriváty kyseliny chinové byly kvantifikovány pomocí kyseliny chinové, deriváty kyselin kaffeoylchinové a kumaroylchinové pomocí kyseliny chlorogenové, deriváty kvercetinu pomocí isokvercitrinu a deriváty kaempferolu pomocí astragalínu.

Obsah jednotlivých látek byl odlišný v závislosti na použité části rostliny, úpravě před skladováním a podmínkách extrakce.

Ve vzorku bobule bylo nalezeno trojnásobné množství glukotropaeolinu v porovnání s fenolickými látkami. Obsah glukotropaeolinu byl u čerstvého vzorku 756,88 $\mu\text{g/g}$, zatímco celkový obsah fenolických látek byl 273,57 $\mu\text{g/g}$. Je zajímavé, že u mraženého vzorku bobule se obsah glukotropaeolinu rapidně snížil, a to na 1,52 $\mu\text{g/g}$. Tento trend lze pozorovat u všech částí rostliny, je tedy zřejmé, že úprava vzorku mražením má na obsah glukotropaeolinu nepříznivý vliv. Naopak macerování vzorků ve 40 ml 70% methanolu po dobu jedné hodiny způsobilo zvýšení extrakční účinnosti. U bobule obsah glukotropaeolinu vzrostl téměř dvojnásobně.

V listu je množství glukotropaeolinu menší (1778,46 $\mu\text{g/g}$), než je celkový obsah fenolických látek (1900,43 $\mu\text{g/g}$). List je částí rostliny, která obsahovala nejvyšší množství fenolických látek, což je patrné i z výsledků antioxidační aktivity, která byla u vzorku listů nejvyšší. Zástupci fenolických látek tvořily hlavně deriváty kvercetinu, které z celkového obsahu zaujímaly 50 %. Zbýlých 35 % pak připadalo na kaffeoylchinové a kumaroylchinové kyseliny, 10 % na kyselinu chinovou a její deriváty a pouhých 5 % tvořily deriváty kaempferolu. Přídavkem 0,3% kyseliny mravenčí před extrakcí došlo ke zvýšení obsahu fenolických látek o 52 % na úkor glukotropaeolinu, jehož množství kleslo téměř devítinásobně. V sušeném vzorku listů byl obsah glukotropaeolinu 1294,17 $\mu\text{g/g}$, obsah fenolických látek pak srovnatelný se vzorkem čerstvým. Množství látek ve vzorcích listů ze dvou různých lokalit byl velmi podobný s jediným rozdílem v obsahu kyseliny kumaroylchinové, kde u listů sbíraných v Třebíči bylo dvojnásobně větší množství, což mohlo být způsobeno i rozdílnou odrůdou rostliny.

U čerstvého vzorku stonku bylo pozorováno dvojnásobně větší množství fenolických látek (477,32 $\mu\text{g/g}$) než u vzorku sušeného (253,26 $\mu\text{g/g}$). Obsah glukotropaeolinu v sušeném vzorku byl 241,25 $\mu\text{g/g}$, v čerstvém vzorku ho bylo trojnásobně více.

Květy jsou část rostliny, která obsahovala největší množství látek s koncentrací nad limitem detekce a kvantifikace. Je zajímavé, že zatímco u listu, stonku a bobule tvořily hlavní zástupce fenolických látek deriváty kvercetinu, u červených květů největší podíl zaujímaly deriváty kaempferolu, což koresponduje s publikovanými výsledky [9]. Z celkového obsahu fenolických látek tvořily 60 %, naopak deriváty kvercetinu pouhých 14 %. Macerováním vzorku v 70% methanolu po dobu jedné hodiny došlo k mírnému nárůstu obsahu fenolických látek. Rozdílem oproti listům je, že nedošlo k úbytku glukotropaeolinu. Žluté květy obsahovaly o 10 % glukotropaeolinu více než květy červené, ale o 28 % méně fenolických

látek. Zatímco u sušeného vzorku červených květů bylo množství derivátů kaempferolu 685,29 $\mu\text{g/g}$, u žlutých květů pouze 244,61 $\mu\text{g/g}$. V literatuře [9] je množství derivátů kaempferolu ve žlutých květech dvakrát menší (296 $\mu\text{g/g}$) než v květech červených (409 $\mu\text{g/g}$). Největší podíl z celkového obsahu fenolických látek ve žlutých květech zaujímaly hydroxyskořicové kyseliny, což koresponduje s publikovaným článkem [9]. Přídavkem 1% kyseliny mravenčí před extrakcí došlo ke zvýšení obsahu fenolických látek u červených květů o 33 %. U vzorku směsi květů připraveného z čerstvé rostliny se po okyselení 0,3% kyselinou mravenčí zvýšil obsah glukotropaeolinu, což je rozdíl oproti vzorkům mraženým, kde okyselením došlo k úbytku. V červených a žlutých květech byl identifikován myricetin hexosid, který v ostatních částech rostliny nebyl. V literatuře [9] byl obsah myricetinu dihexosidu v červených květech výrazně vyšší (110 $\mu\text{g/g}$) než v květech žlutých (5 $\mu\text{g/g}$). Vzorek sušených žlutých květů obsahoval v porovnání s ostatními částmi rostliny největší množství kyseliny chinové (5,35 $\mu\text{g/g}$). Přídavkem 1% kyseliny mravenčí došlo k zvýšení jejího obsahu o 10 %, u červených květů došlo k nárůstu o 82 %. Mražením se množství kyseliny chinové u všech vzorků mírně zvýšilo.

Závěr

Náplní diplomové práce byla identifikace a kvantifikace fenolických látek společně s glukotropaeolinem ve vzorcích lichořeřišnice větší a také studium antioxidační aktivity.

První část diplomové práce je zaměřena na stanovení antioxidační aktivity metodami ABTS a DPPH, stanovení celkového množství fenolických látek a celkového množství anthokyaninů a využitím spektrofotometrických technik. V první řadě byla provedena optimalizace metody spočívající ve výběru vhodného objemu dávkovaného vzorku. Následně byla provedena kalibrace s využitím standardů-Trolox pro ABTS a DPPH, kyselina gallová pro FCM. Změna absorbance byla přepočtena na celkovou antioxidační aktivitu, celkové množství fenolických látek a anthokyaninů vztažené na jeden gram čerstvého vzorku. Bylo zjištěno, že největší antioxidační aktivita a obsah fenolických látek je v listech, naopak nejmenší ve stonku. Bylo potvrzeno, že anthokyaniny se ve velké míře vyskytují v květech rostliny, nejvíce v červeně zbarvených. V ostatních částech rostliny je jejich obsah vzhledem ke květům zanedbatelný.

Druhá část diplomové práce byla zaměřena na identifikaci a kvantifikaci fenolických látek společně s glukotropaeolinem v methanolických extraktech. Nejprve byla provedena optimalizace chromatografické separace a hmotnostně spektrofotometrické detekce. Pro analýzu látek byla zvolena kolona Kinetex Polar C18 (150 mm × 3 mm × 2,6 μm). Separace probíhala za gradientové eluce za použití acetonitrilu a okyselené vody (pH 2,5) jako mobilní fáze. Všechny látky byly separovány do 7,5 minut. Za účelem identifikace byla pro protonované a deprotonované molekuly provedena MS/MS analýza ke zjištění fragmentových iontů. Poté byla provedena kalibrace s využitím standardu kyseliny chinové, kyseliny chlorogenové, glukotropaeolinu, astragalinu a isokvercitrinu. Kalibrační křivky byly vyhodnoceny v programu QC Expert a z parametrů lineární regrese byl stanoven obsah jednotlivých látek v methanolických extraktech lichořeřišnice větší. Bylo zjištěno, že největší množství fenolických látek a glukotropaeolinu obsahují vzorky listů. Zatímco u listů tvoří hlavní podíl fenolických látek deriváty kvercetinu, u květů jsou hlavní zástupci deriváty kaempferolu. Nejmenší množství látek je ve stonku a bobulích. Srovnáním obsahu látek ve vzorcích s různou úpravou pro skladování se potvrdilo, že mražením vzorků rostliny se obsah glukotropaeolinu prudce snižuje. Přídavkem kyseliny mravenčí před extrakcí dochází k velkému zvýšení obsahu fenolických látek na úkor glukotropaeolinu, jehož množství se vlivem kyseliny snižuje.

4 Seznam literatury

- [1] BRONDANI, Calil Juliana, CUELHO, Ferreira Helena Camila, MARANGONI, Damo Lucas, DE LIMA, Rachel, GUEX, Gaube Camille, BONILHA, De Franca Iuri, MANFRON, Palermo Melania. Traditional usages, botany, phytochemistry, biological activity and toxicology of *Tropaeolum majus* L. - A review. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* **2016**, 15 (4). ISSN 0717-7917.
- [2] BAZYLKO, Agnieszka, GRANICA, Sebastian, FILIPEK, Agnieszka, PIWOWARSKI, Jakub, STEFANSKA, Joanna, OSINSKA, Ewa, KISS, Anna K. Comparison of antioxidants, anti-inflammatory, antimicrobial activity and chemical composition of aqueous and hydroethanolic extracts of the herb of *Tropaeolum majus* L. *Industrial Crops and Products* **2013**, 50, 88-94. ISSN 0926-6690.
- [3] NIIZU, Patricia Y., RODRIGUES-AMAYA, Delia B. Flowers and leaves of *Tropaeolum majus* L. as rich sources of lutein. *Journal of Food Science* **2005**, 70 (9), S605-S609. ISSN 0022-1147.
- [4] BAZYLKO, Agnieszka, PARZONKO, Andrzej, JEZ, Wioletta, OSINSKA, Ewa, KISS, Anna K. Inhibition of ROS production, photoprotection, and total phenolic, flavonoids and ascorbic acid content of fresh herb juice and extracts from the leaves and flowers of *Tropaeolum majus*. *Industrial Crops and Products* **2014**, 55, 19-24. ISSN 1872-633X.
- [5] GARZON, Gloria Astrid, WROLSTAD, Ronald E. Major anthocyanins and antioxidant activity of *Nasturtium* flowers (*Tropaeolum majus*). *Food Chemistry* **2009**, 114 (1), 44-49. ISSN 0308-8146.
- [6] JAKUBCZYK, Karolina, JANDA, Katarzyna, WATYCHOWICZ, Katarzyna, LUKASIAK, Jagoda, WOLSKA, Jolanta. Garden *Nasturtium* (*Tropaeolum Majus* L.) – A source of mineral elements and bioactive compounds. *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny* **2018**, 69 (2), 119-126.
- [7] BIOLIB. Dostupné z: <https://www.biolib.cz/cz/taxon/id3583/> [16. 1. 2019].
- [8] GASPAROTTO JUNIOR, Arquimedes, BOFFO, Marcos Aurelio, BOTELHO LOURENCO, Emerson Luiz, ALVES STEFANELLO, Maria Elida, LEITE KASSUYA, Candida Aparecida, ANDRADE MARQUES, Maria Consuelo. Natriuretic and diuretic effects of *Tropaeolum majus* (*Tropaeolaceae*) in rats. *Journal of Ethnopharmacology* **2009**, 122 (3), 517-522. ISSN 0378-8741.
- [9] GARZÓN, Astrid G., MANNS, David C., RIEDL, Ken, SCHWARTZ, Steven J., ZAKOUR-PADILLA, Olga. Identification of Phenolic Compounds in Petals of *Nasturtium* Flowers (*Tropaeolum majus*) by High-Performance Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry and Determination of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2015**, 63, 1803-1811.
- [10] COOK, Natalie C., SAMMAN, Samir. Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Journal of nutritional biochemistry* **1996**, 7 (2), 66-76. ISSN 0955-2863.
- [11] JANICIJEVIC, Jelena, TOŠIĆ, Svetlana, MITROVIC, Tatjana. Flavonoids in plants. *9th Symposium on Flora of Southeastern Serbia and Neighbouring Regions* **2007**, 153-156.

- [12] SAMANTA, Amalesh, DAS, Gouranga, DAS, Sanjoy Kumar. Roles of flavonoids in plants. *International Journal of pharmaceutical science and technology* **2011**, 6 (1), 12-35. ISSN 0975-0525.
- [13] POURCEL, Lucille, ROUTABOUL, Jean-Marc, CHEYNIER, Véronique, LEPINIEC, LOIC, DEBEAUJON, Isabelle. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends in Plant Science* **2006**, 12 (1), 30-36. ISSN 1360-1385.
- [14] PIETTA, Pier-Giorgio. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Product*. **2000**, 63, 1035-1042. ISSN 0163-3864
- [15] CLIFFORD, Michael N. Anthocyanins - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of food and Agriculture* **2000**, 80 (7), 1063-1072. ISSN 0022-5142
- [16] PERICLES, Markakis. Anthocyanins as Food Colors. New York: Academic Press, INC. 1982. ISBN 0-12-472550-3. Dostupné z: https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=SN8XbvA1w8gC&oi=fnd&pg=PP1&dq=anthocyanins&ots=bghpCmGZkP&sig=fRL010Lioeb00ijZSfAzZ66wXUk&redir_esc=y#v=onepage&q=anthocyanins&f=false
- [17] EL-SEEDI, Hesham R., EL-SAID, Asmaa M. A., KHALIFA, Shaden A. M., GORANSSON, Ulf, BOHLIN, Lars, BORG-KARLSON, Anna-Karin, VERPOORTE, Rob. Biosynthesis, Natural Sources, Dietary Intake, Pharmacokinetic Properties, and Biological Activities of Hydroxycinnamic Acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2012**, 60 (44), 10877-0895. ISSN 1520-5118.
- [18] CLARKE, Don Brian. Glucosinolates, structures and analysis in food. *Critical Review* **2010**, 2, 310-325. ISSN 1759-9660.
- [19] BASKAR, Venkidasamy, GURURANI, Mayank Anand, YU, Jae Woong, PARK, Se Won. Engineering Glucosinolates in Plants: Current Knowledge and Potential Uses. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2012**, 168, 1694-1717. ISSN 1559-0291.
- [20] MITHEN, Richard. Glucosinolates - biochemistry, genetics and biological activity. *Plant Growth Regulation* **2001**, 34 (1), 91-103. ISSN 0167-6903.
- [21] FALK, Kimberly L., TOKUHISA, James G., GERSHENZON, Jonathan. The effect of sulfur nutrition on plant glucosinolate content: Physiology and molecular mechanisms. *Plant biology* **2007**, 9 (5), 573-581. ISSN 1435-8603.
- [22] Glucotropaeolin. *Toxnet* ® [online]. Bethesda: U. S. National Library of Medicine, ©2005. Last Update: 18 January 2017. [cit. 21. 1. 2019]. Dostupné z: <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/499-26-3>
- [23] ŽÁK, Aleš. *Ateroskleróza: Nové pohledy*. 1st ed. Grada Publishing, a.s. 2011. [cit. 8. 4. 2018]. Dostupné z: https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=eBpgAgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA49&dq=kyselina+olejov%C3%A1&ots=JmMma7JknC&sig=gNGwj6nIV5htn5GdqY1TKtG1yMQ&redir_esc=y#v=onepage&q=kyselina%20olejov%C3%A1&f=false
- [24] GUNSTONE, Frank. *Fatty acid and lipid chemistry*. 1st ed. Springer Science+Business Media Dordrecht 1996. [cit. 8. 4. 2018]. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=QYUpBAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA1&dq>

[=fatty+acids+chemistry&ots=554maqr3r&sig=hqTdYlifDJgcnWtRJ5E8qH7RL-w&redir_esc=y#v=onepage&q=fatty%20acids%20chemistry&f=false](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/erucicacid3385711286711?lang=en®ion=CZ)

- [25] Oleic acid. Sigma-Aldrich® [online]. Praha: Sigma-Aldrich, ©2018. [cit. 8. 4. 2018]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/erucicacid3385711286711?lang=en®ion=CZ>
- [26] Erucic acid. Sigma-Aldrich® [online]. Praha: Sigma-Aldrich, ©2018. [cit. 8. 4. 2018]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/erucicacid3385711286711?lang=en®ion=CZ>
- [27] Linoleic acid. Sigma-Aldrich® [online]. Praha: Sigma-Aldrich, ©2018. [cit. 8. 4. 2018]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/linoleicacid280456033311?lang=en®ion=CZ>
- [28] RAO, Anjali Venkes S., RAO, Leticia Gomez. Carotenoids and human health. *Pharmacological Research* **2007**, 55 (3), 207-216. ISSN 1043-6618.
- [29] STAHL, Wilhelm, SIES, Helmut. Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine* **2003**, 24 (6), 345-351. ISSN 1872-9452.
- [30] PREEDY, Victor R. *Vitamin A and Carotenoids: Chemistry, Analysis, Function and Effects*. Royal Society of Chemistry 2012. [cit. 15. 4. 2018] Dostupné z: https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=snMoDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR7&dq=carotenoids+chemistry&ots=1uVpzDKDzV&sig=MW867He1Uz3yOn6y6rqsKAZ3Zgs&redir_esc=y#v=onepage&q=carotenoids%20chemistry&f=false
- [31] Beta-carotene. Sigma-Aldrich® [online]. Praha: Sigma-Aldrich, ©2018. [cit. 15. 4. 2018]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/usp/1065480?lang=en®ion=CZ>
- [32] Lutein. Sigma-Aldrich® [online]. Praha: Sigma-Aldrich, ©2018. [cit. 15. 4. 2018]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/07168?lang=en®ion=CZ>
- [33] DU, Juan, CULLEN, Joseph J., BUETTNER, Garry R. Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochimica et Biophysica Acta-Reviews on Cancer* **2012**, 1826 (2), 443-457. ISSN 0006-3002.
- [34] Ascorbic acid. Sigma-Aldrich® [online]. Praha: Sigma-Aldrich, ©2018. [cit. 16. 4. 2018]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/bp461?lang=en®ion=CZ>
- [35] ARRIGONI, Oreste, DE TULLIO, Mario C. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects* **2002**, 1569 (1-3), 1-9. ISSN 1872-8006.
- [36] CONKLIN, Patricia L. Recent advances in the role and biosynthesis of ascorbic acid in plants. *Plant cell and Environment* **2001**, 24 (4), 383-394. ISSN 0140-7791.
- [37] LINSTER, Carole L., VAN SCHAFTINGEN, Emile. Vitamin C - Biosynthesis, recycling and degradation in mammals. *Febs Journal* **2007**, 274 (1), 1-22. ISSN 1742-4658.

- [38] SMIRNOFF, Nicholas. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of botany* **1996**, 78 (6), 661-669. ISSN 0305-7364.
- [39] GASPAROTTO JUNIOR, Arquimedes, LIMA PRANDO, Thiago Bruno, VILHENA LEME, Thiago dos Santos, GASPAROTTO, Francielly Mourao, BOTELHO LOURENCO, Emerson Luiz, RATTMANN, Yanna Dantas, DA SILVA-SANTOS, Jose Eduardo, LEITE KASSAUYA, Candida Aparecida, ANDRADE MARQUES, Maria Consuelo. Mechanisms underlying the diuretic effects of *Tropaeolum majus* L. extracts and its main component isoquercitrin. *Journal of Ethnopharmacology* **2012**, 141 (1), 501-509. ISSN 0378-8741.
- [40] GASPAROTTO JUNIOR, Arquimedes, GASPAROTTO, Francielly Mourao, BOFFO, Marcos Aurelio, BOTELHO LOURENCO, Emerson Luiz, ALVES STEFANELLO, Maria Elida, SALVADOR, Marcos Jose, DA SILVA-SANTOS, Jose Eduardo, ANDRADE MARQUES, Maria Consuelo, LEITE KASSUYA, Candide Aparecida. Diuretic and potassium-sparing effect of isoquercitrin-An active flavonoid of *Tropaeolum majus* L. *Journal of Ethnopharmacology* **2011**, 134 (2), 210-215. ISSN 0378-8741.
- [41] GASPAROTTO JUNIOR, Arquimedes, LIMA PRANDO, Thiago Bruno, GEBARA, Karimi Sater, GASPAROTTO, Francielly Mourao, DOS REIS LIVERO, Francislaine Aparecida, DE LIMA, Denis Pires, GOMES, Roberto da Silva, BOTELHO LOURENCO, Emerson Luiz. Protective Cardioresenal Effects Of *Tropaeolum majus* L. In Rats With Renovascular Hypertension. *Journal of Young Pharmacists* **2017**, 9 (2), 251-257. ISSN 0975-1505.
- [42] GASPAROTTO JUNIOR, Arquimedes, GASPAROTTO, Francielly Mourao, BOTELHO LOURENCO, Emerson Luiz, CRESTANI, Sandra, ALVES STEFANELLO, Maria Elida, SALVADOR, Marcos Jose, DA SILVA-SANTOS, Jose Eduardo, ANDRADE MARQUES, Maria Consuelo, LEITE KASSAUYA, Candida Aparecida. Antihypertensive effects of isoquercitrin and extracts from *Tropaeolum majus* L.: Evidence for the inhibition of angiotensin converting enzyme. *Journal of Ethnopharmacology* **2011**, 134 (2), 363-372. ISSN 0378-8741.
- [43] TRAN, Hoai Thi Thu, MARTON, Melinda-Rita, HERZ, Corinna, MAUL, Ronald, BALDERMANN, Susanne, SCHREINER, Monika, LAMY, Evelyn. Nasturtium (Indian cress, *Tropaeolum majus nanum*) dually blocks the COX and LOX pathway in primary human immune cells. *Phytomedicine* **2016**, 23 (6), 611-620. ISSN 1618-095X.
- [44] BLOEM, Elke, BERK, Andreas, HANEKLAUS, Silvia, SELMAR, Dirk, SCHNUG, Ewald. Influence of *Tropaeolum majus* supplements on growth and antimicrobial capacity of glucotropaeolin in piglets. *Landbauforschung Volkenrode* **2008**, 58 (3), 203-210. ISSN 0458-6859.
- [45] FERNANDES, Luana, CASAL, Susana, PEREIRA, José Alberto, SARAIVA, Jorge A., RAMALHOSA, Elsa. Edible flowers: A review of the nutritional, antioxidant, antimicrobial properties and effects on human health. *Journal of Food Composition and Analysis* **2017**, 60, 38-50.
- [46] RODRIGUEZ-AMAYA, Delia B., KIMURA, Mieko, GODOY, Helena T., AMAYA-FARFAN, Jaime. Updated Brazilian database on food carotenoids: Factors affecting carotenoid composition. *Journal of Food Composition and Analysis* **2008**, 21 (6), 445-463. ISSN 1096-0481.

- [47] GUL, Khalid, TAK, Afshan, SINGH, A. K., SINGH, Preeti, YOUSUF, Basharat, WANI, Ali Abas. Chemistry, encapsulation, and health benefit of β -carotene- A review. *Cogent Food&Agriculture* **2015**, 1-12.
- [48] HEIM, Kelly E., TAGLIAFERRO, Anthony R., BOBILYA, Dennis J. Flavonoids antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **2002**, 13 (10), 572-584.
- [49] PISOSCHI, Aurelia Magdalena, NEGULESCU, Gheorghe Petre. Methods of Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochemistry & Analytical Biochemistry* **2011**.
- [50] SOCHOR, Jiří, RYVOLOVÁ, Markéta, KRYŠTOFOVÁ, Olga, SALAS, Petr, HUBALEK, Jaromír, ADAM, Vojtěch, TRNKOVÁ, Libuše, HAVEL, Ladislav, BEKLOVÁ, Miroslava, ZEHNÁLEK, Josef, PROVAZNÍK, Ivo, KIZEK, René. Fully Automated Spectrometric Protocols for Determination of Antioxidant Activity: Advantages and Disadvantages. *Molecules* **2010**, 15, 8618-8640. ISSN 1420-3049.
- [51] DENEV, Petko, CIZ, Milan, AMBROZOVA, Gabriela, LOJEK, Antonin, YANAKIEVA, Irina, KRATCHANOVA, Maria. Solid phase extraction of berries' anthocyanins and evaluation of their antioxidative properties. *Food Chemistry* **2010**, 123 (4), 1055-1061. ISSN 1873-7072.
- [52] PAULOVÁ, Hana, BACHOŘÁKOVÁ, Hana, TÁBORSKÁ, Eva. Metody stanovení antioxidantní aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické listy* **2004**, 98, 174-179.
- [53] BOLIGON, Aline Augusti, JANOVIK, Vanessa, BOLIGON, Alexandra Augusti, PIVETTA, Carina Rejane, PEREIRA, Romaiiana Picada, DA ROCHA, Joao Batista Teixeira, ATHAYDE, Margareth Linde. HPLC Analysis of Polyphenolic Compounds and Antioxidant Activity in Nasturtium officinale. *International Journal of Food Properties* **2011**. ISSN 1532-2386
- [54] GONZÁLEZ-BARRIO Rocio, PERIAGO, Jesús María, LUNA-RECIO, Cristina, JAVIER, Francisco García-Alonso, NAVARRO-GONZÁLEZ, Immaculada. Chemical composition of the edible flowers, pansy (*Viola wittrockiana*) and snapdragon (*Antirrhinum majus*) as new sources of bioactive compounds. *Food Chemistry* **2018**, 252, 373-380. ISSN 1873-7072.
- [55] NAVARRO-GONZÁLEZ, Immaculada, GONZÁLEZ-BARRIO, Rocío, GARCÍA-VALVERDE, Verónica, BAUTISTA-ORTÍN, Ana Belén, PERIAGO, Maria Jesús. Nutritional Composition and Antioxidant Capacity in Edible Flowers: Characterisation of Phenolic Compounds by HPLC-DAD-ESI/MSⁿ. *International Journal of Molecular Sciences* **2015**, 16, 805-822. ISSN 1422-0067.
- [56] PODSEDEK, Anna. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT-Food Science and Technology* **2007**, 40 (1), 1-11. ISSN 0023-6438.
- [57] MÜLLER, Eckhart, BERGER, Rosemarie, BLASS, Eckhart, SLUYTS, Domien, PFENNIG, Andreas. *Ulmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2012.
- [58] REZAEI, Mohammad, ASSADI, Yaghub, HOSSEINIA, Mohammad-Reza Milani, AGHAEI, Elham, AHMADI, Fardin, BERIJANI, Sana. Determination of organic

- compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, **2006**, 1116 (1-2), 1-9. ISSN 1873-3778.
- [59] YANG, Yi, ZHANG, Fan. Ultrasound-assisted extraction of rutin and quercetin from *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb. *Ultrasonics Sonochemistry* **2008**, 15 (4), 308-313. ISSN 1350-4177.
- [60] ROSA DE MEDEIROS, Jorge Manuel, MACEDO, Manuêlo, CONTANCIA, P. Joao, NGUYEN, Chi, CUNNINGHAM, Glenn, MILES, D. Howard. Antithrombin activity of medicinal plants of the Azores. *Journal of Ethnopharmacology*, **2000**, 72, 157-165. ISSN 0378-8741.
- [61] DE CASTRO, Maria Dolores Luque, PRIEGO-CAPOTE, Feliciano. Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*, **2010**, 1217, 2383-2389. ISSN 1873-3778.
- [62] KORIEM, Khaled M. M., ARBID, Mahmoud S., EL-GENDY, Nadia F. I. The protective role of *Tropaeolum majus* on blood and liver toxicity induced by diethyl maleate in rats. *Toxicology Mechanism and Methods*, **2010**. 20 (9), 579-586. ISSN1537-6516.
- [63] Thomas Jennings A. Lyophilization: Introduction and Basic Principles. Boca Raton, Florida: Taylor & Francis Group 1999. ISBN 978-1-4398-0607-4.
- [64] HANDA, Sukhdev Swami, KHANUJA, Suman Preet Singh, LONGO, Gennaro, RAKESH, Dev Dutt. Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. International Centre for Science and High Technology **2008**.
- [65] GUBTA, Vibha, et al. Development and validation of HPLC method- a review. *International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences*, **2012**, 2 (4), 17-25. ISSN 2277-4149.
- [66] Heinz Engelhardt. *High Performance Liquid Chromatography*. Springer Science & Business Media, 2012. [cit. 4. 7. 2018] ISBN: 3642670644. Dostupné z: https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=sIHxCAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA1&dq=high+performance+liquid+chromatography&ots=ZONHVcO0CG&sig=HiwsxDxkgFHdK55hnZN5Vw9q7Pc&redir_esc=y#v=onepage&q=high%20performance%20liquid%20chromatography&f=false
- [67] Leo M. L. Nollet, Fidel Toldrá. Food Analysis by HPLC, 3rd. ed. NW: Taylor & Francis Group 2013. ISBN: 978-1-4398-3085-7. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=x13RBQAAQBAJ&pg=PA539&lpg=PA539&dq=hplc+scheme&source=bl&ots=3GnuFcXt4h&sig=uCGmlmTy4C1bTDKR41NGqdLp7bI&hl=cs&sa=X&ved=2ahUKEwi7xa3M3e3dAhWStosKHVjmDQc4FBD0ATABegQICBAB#v=onepage&q=hplc%20scheme&f=false>
- [68] KUPIEC T., PhD. Quality-Control Analytical Methods: High - Performance Liquid Chromatography [online]. International Journal of Pharmaceutical Compounding, 2004, 8(3).
- [69] <https://laboratoryinfo.com/hplc/> [cit. 29. 1. 2019]
- [70] FEKETE, Szabolcs, SCHAPPLER, Julie, VEUTHEY, Jean-Luc, GUILLARME, Davy. Current and future trends in UHPLC. *Trac-trends in analytical chemistry* **2014**, 63, 2-13. ISSN 1879-3142.

- [71] NOVÁKOVÁ, Lucie, DOUŠA, Michal a kolektiv. Moderní HPLC separace v teorii a praxi I. 1. vydání. Praha: Eurosprit a.s. 2013. ISBN: 978-80-260-4243-3.
- [72] Veronika R. Meyer. Practical High-Performance Liquid Chromatography, 5th ed. UK: John Wiley & Sons, 2010. ISBN: 978-0470-682180. Dostupné z: https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=ODRYwLsJy3AC&oi=fnd&pg=PT9&dq=high+performance+liquid+chromatography&ots=yP9yf6BA6&sig=9WJkoAkdh_YUAAAtXUfaEM4CSH9s&redir_esc=y#v=onepage&q=high%20performance%20liquid%20chromatography&f=false
- [73] ZOTOU, Anastasia. An overview of recent advances in HPLC instrumentation. *Central European Journal of Chemistry*, **2012**, 10 (3), 554-569. ISSN 1644-3624.
- [74] HOLČAPEK, Michal, JANDERA, Pavel. Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS). *Chemické listy* **1998**, 92, 278-286.
- [75] ADVION BIOSYSTEMS INC. Liquid chromatography-mass spectrometry. Gary A. SCHULTZ, Reinaldo Rodrigo Queiros de ALMEIDA, Mark Haydn ALLEN. US12053051. 21. 3. 2008.
- [76] Převzato a upraveno z: www.chemyx.com [cit. 29. 1. 2019]
- [77] FRIEDECKÝ, D., LEMR, K. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus* **2012**, 20 (41), 152-157.
- [78] KOIKE, Amanda, BARREIRA, João C. M., BARROS, Lillian, SANTOS-BUELGA, Celestino, VILLAVICENCIO, Anna L. C. H., FERREIRA, Isabel C. F. R. Irradiation as a novel approach to improve quality of *Tropaeolum majus* L. flowers: Benefits in phenolic profiles and antioxidant activity. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **2015**, 30, 138-144. ISSN 1878-5522.
- [79] RUTNAKORNPITUK, Boonjira, BOONTHIP, Chatchai, SANGUANKUL, Waraporn, SAWANGSUP, Pimtawan, RUTNAKORNPITUK, Metha. Study in Total Phenolic Contents, antioxidant Activity and Analysis of Glucosinolate Compounds in Cruciferous Vegetables. *Naresuan University Journal: Science and Technology* **2018**, 26 (2).
- [80] ROSSETTO, Maria Rosecler Miranda, SHIGA, Tania Mizuzo, VIANELLO, Fabio, LIMA, Giuseppina Pace Pereira. Analysis of total glucosinolates and chromatographically purified benzylglucosinolate in organic and conventional vegetables. *LWT-Food Science and Technology* **2013**, 50, 247-252. ISSN 0023-6438.
- [81] RADOŠEVIC, Kristina, SRČEK, Višnja Gaurina, BUBALO, Marina Cvjetko, BRNČIĆ, Suzana, Rimac, TAKACS, Krisztina, REDOVNIKOVIC, Ivana Radojčić. Assessment of glucosinolates, antioxidative and antiproliferative activity of broccoli and collard extracts. *Journal of Food Composition and Analysis* **2017**, 61, 59-66. ISSN 1096-0481.
- [82] JO, Jung Su, BHANDARI, Shiva Ram, KANG, Gwan Ho, LEE, Jun Glu. Comparative Analysis of Individual Glucosinolates, Phytochemicals and Antioxidant Activities in Broccoli Breeding Lines. *Horticultural Environmental Biotechnology* **2016**, 57 (4), 392-403. ISSN 2211-3460.
- [83] WIELANEK, Marzena, URBANEK, Henryk. Glucotropaeolin and myrosinase production in hairy root cultures of *Tropaeolum majus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **1999**, 57, 39-45. ISSN 0167-6857.

- [84] ARES, Ana M., BERNAL, José, NOZAL, Maria J., TURNER, Charlotta, PLAZA, Merichel. Fast determination of intact glucosinolates in broccoli leaf by pressurized liquid extraction and ultra high performance liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Food Research International* **2015**, 76, 498-505. ISSN 1873-7145.
- [85] ARES, Ana M., NOZAL, Maria J., BERNAL, José L., BERNAL José. Optimized extraction, separation and quantification of twelve intact glucosinolates in broccoli leaves. *Food Chemistry* **2014**, 152, 66-74. ISSN 1873-7072.
- [86] ARES, Ana M., NOZAL, Maria J., BERNAL, José L. Effect of Temperature and Light Exposure on the Detection of Total Intact Glucosinolate Content by LC-ESI-MS in Broccoli Leaves. *Food Analytical Methods* **2014**, 7, 1687-1692. ISSN 1936-9751.
- [87] MOREIRA-RODRIGUEZ, Melissa, NAIR, Vimal, BENAVIDES, Jorge, CISNEROS-ZEVALLOS, Luis, JACOBO-VELAZQUEZ, Daniel A. UVA, UVB Light, and Methyl Jasmonate, Alone or Combined, Redirect the Biosynthesis of Glucosinolates, Phenolics, Carotenoids, and Chlorophylls in Broccoli Sprouts. *International Journal of Molecular Sciences* **2017**, 18 (11). ISSN 1422-0067.
- [88] THOMAS, Minty, BADR, Ashraf, DESJARDINS, Yves, GOSSELIN, Andre, ANGERS, Paul. Characterization of industrial broccoli discards (*Brassica oleracea* var. *italica*) for their glucosinolate, polyphenol and flavonoid contents using UPLC MS/MS and spectrophotometric methods. *Food Chemistry* **2018**, 245, 1204-1211. ISSN 1873-7072.
- [89] WROLSTAD, Ronald E., GIUSTI, Mónica M. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy, *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, **2001**.

5 PŘÍLOHY

TABULKY

Tabulka P1: Průměrné hodnoty TEAC u vzorků lichořeřišnice větší-metoda ABTS.

označení	TEAC [mmol/g]
Č1	0,0463±0,0008
Č1a	0,0432±0,0002
Č2	0,0463±0,0001
Č2c	0,0439±0,0003
Č2d	0,0399±0,0006
Ž1	0,0356±0,0004
Ž2	0,0313±0,0003
Ž2c	0,0196±0,0003
Ž2d	0,0173±0,0002
Č3	0,0428±0,0002
K3c	0,0276±0,0002

označení	TEAC [mmol/g]
B1	0,0368±0,0003
B1a	0,0546±0,0004
B2	0,0544±0,0003
B3	0,0405±0,0002
S1	0,0129±0,0001
S3	0,0192±0,0001
L1	0,0646±0,0002
L1a	0,0607±0,0004
L2	0,0505±0,0002
L1b	0,0654±0,0002
L2c	0,0601±0,0001
L2d	0,0488±0,0002
L3	0,0504±0,0001
L3c	0,0376±0,0003

Tabulka P2: Průměrné hodnoty TEAC u vzorků lichořeřišnice větší-metoda DPPH.

označení	TEAC [mmol/g]
Č1	0,0277±0,0003
Č1a	0,0271±0,0002
Č2	0,0264±0,0003
Č2c	0,0285±0,0002
Č2d	0,0299±0,0003
Ž1	0,0224±0,0006
Ž2	0,0211±0,0003
Ž2c	0,0175±0,0004
Ž2d	0,0165±0,0001
Č3	0,0257±0,0002
K3c	0,0173±0,00004

označení	TEAC [mmol/g]
B1	0,0301±0,0002
B1a	0,0531±0,0003
B2	0,0446±0,0002
B3	0,0309±0,0002
S1	0,0084±0,0001
S3	0,0166±0,0001
L1	0,0595±0,0002
L1a	0,0595±0,0002
L2	0,0534±0,0002
L1b	0,0573±0,0005
L2c	0,0568±0,0001
L2d	0,0577±0,0002
L3	0,0509±0,0002
L3c	0,0420±0,0001

Tabulka P3: Průměrné hodnoty celkového obsahu fenolických látek ve vzorcích lichořeřišnice větší.

označení	kyselina gallová (mg/g)
Č1	2,4960±0,0133
Č1a	2,5640±0,0127
Č2	2,7720±0,0157
Č2c	3,3600±0,0120
Č2d	3,5840±0,0202
Ž1	1,9520±0,0430
Ž2	2,0040±0,0043
Ž2c	1,6990±0,0162
Ž2d	1,3870±0,0096
Č3	2,3560±0,0096
K3c	2,1300±0,0061

označení	kyselina gallová (mg/g)
B1	1,5480±0,0036
B1a	2,3900±0,0212
B2	2,7780±0,0091
B3	1,8927±0,0106
S1	0,5920±0,0115
S3	1,0582±0,0156
L1	4,0205±0,0069
L1a	3,4378±0,0117
L2	4,5300±0,0317
L1b	3,9500±0,0048
L2c	11,1128±0,0158
L2d	7,0720±0,0104
L3	3,7380±0,0109
L3c	3,8100±0,0113

Tabulka P4: Průměrný obsah anthokyaninů ve vzorcích lichořeřišnice větší.

označení	mg pg-3-glu/g vzorku
Č1	1,1490±0,0078
Č1a	1,1375±0,0007
Č2	1,1550±0,0006
Č2c	1,4300±0,0032
Č2d	1,5330±0,0055
Ž1	0,2731±0,0041
Ž2	0,2729±0,0022
Ž2c	0,1150±0,0019
Ž2d	0,1019±0,0022
Č3	1,1823±0,0027
K3c	0,7950±0,0037

označení	mg pg-3-glu/g vzorku
B1	0,0218±0,0038
B1a	0,0181±0,0030
B2	0,0047±0,0020
B3	0,0238±0,0021
S1	0,0230±0,0025
S3	0,0390±0,0024
L1	0,0652±0,0041
L1a	0,0570±0,0142
L2	0,0357±0,0030
L1b	0,0674±0,0052
L2c	0,0364±0,0040
L2d	0,0097±0,0039
L3	0,0250±0,0039
L3c	0,0267±0,0029

Tabulka P5: Zastoupení jednotlivých látek v mražených vzorcích, koncentrace µg/g.

LÁTKA	ČÍSLO	VZOREK			
		B2	L2	Č2	Ž2
kyselina chinová	1	2,88	3,64	6,13	7,80
derivát kyseliny chinové	2	257,6	213,4	48,93	93,15
derivát kyseliny chinové	3	83,60	44,68	22,09	24,61
glukotropaeolin	4	1,52	340,3	477,1	3,99
kyselina kaffeoylchinová	5	<LOD	<LOQ	1,73	2,63
kyselina neochlorogenová	6	<LOQ	1,61	31,55	37,25
kyselina kumaroylchinová	7	<LOD	<LOQ	27,08	39,32
kyselina kumaroylchinová	8	<LOQ	0,40	42,32	53,12
kyselina chlorogenová	9	37,62	390,0	95,90	113,6
kyselina kaffeoylchinová	11	0,51	0,94	0,55	0,42
kyselina kumaroylchinová	12	<LOD	1,10	1,65	2,15
derivát kvercetinu	14	<LOD	<LOD	1,64	0,18
derivát kaempferolu	15	<LOD	<LOD	17,04	0,97
kyselina kumaroylchinová	16	<LOD	1,27	1,75	2,33
kyselina kumaroylchinová	17	1,11	195,1	14,64	25,20
derivát kvercetinu	18	2,75	4,12	16,97	19,27
kyselina kumaroylchinová	19	1,33	264,3	12,95	27,52
derivát kvercetinu	20	<LOD	<LOD	0,23	<LOQ
myricetin hexosid	21	<LOD	<LOD	9,39	10,20
derivát kvercetinu	22	0,49	3,58	5,40	3,51
derivát kaempferolu	23	0,73	0,89	479,7	182,7
derivát kaempferolu	24	<LOD	<LOD	13,32	5,13
derivát kaempferolu	25	<LOQ	0,46	66,97	20,76
derivát kaempferolu	26	<LOQ	0,67	91,25	26,46
derivát kaempferolu	27	<LOQ	<LOQ	3,23	1,15
isokvercitrin	28	0,58	26,99	8,28	10,21
derivát kvercetinu	30	<LOQ	1,96	0,50	0,54
derivát kvercetinu	31	21,89	761,7	81,76	93,77
derivát kvercetinu	33	<LOD	<LOD	0,36	<LOQ
astragalin	34	0,14	2,59	76,73	24,84
derivát kvercetinu	35	0,96	44,06	2,88	4,03
derivát kvercetinu	36	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
derivát kaempferolu	37	0,31	118,8	58,90	49,75
derivát kvercetinu	38	2,92	38,69	10,72	10,37

Tabulka P6: Zastoupení jednotlivých látek v extraktech připravených z čerstvé rostliny, koncentrace µg/g.

LÁTKA	ČÍSLO	VZOREK					
		B3	L3	S3	Č3	L3c	K3c
kyselina chinová	1	2,27	1,83	4,43	5,18	2,35	2,86
derivát kyseliny chinové	2	167,8	175,2	120,1	55,42	439,4	59,60
derivát kyseliny chinové	3	18,48	23,31	21,85	10,79	157,1	11,76
glukotropaeolin	4	756,9	1778,5	708,7	766,3	1737,1	1032,2
kyselina kaffeoylchinová	5	<LOD	<LOQ	0,44	1,54	<LOQ	21,86
kyselina neochlorogenová	6	<LOQ	2,37	5,76	26,43	1,92	21,46
kyselina kumaroylchinová	7	<LOQ	<LOQ	1,25	21,09	<LOQ	16,82
kyselina kumaroylchinová	8	<LOQ	<LOQ	1,32	40,43	<LOQ	29,44
kyselina chlorogenová	9	40,26	402,5	74,63	78,09	416	82,54
kyselina kaffeoylchinová	11	4,05	14,08	6,73	5,67	40,57	40,81
kyselina kumaroylchinová	12	<LOD	0,55	<LOQ	1,97	0,54	1,32
derivát kvercetinu	14	<LOD	<LOD	<LOD	2,87	<LOD	1,72
derivát kaempferolu	15	<LOD	<LOD	<LOD	12,38	<LOD	8,84
kyselina kumaroylchinová	16	<LOD	0,44	<LOD	2,49	0,62	1,50
kyselina kumaroylchinová	17	0,92	107,8	2,16	15,49	112,1	11,85
derivát kvercetinu	18	2,02	5,16	4,92	15,74	4,13	13,85
kyselina kumaroylchinová	19	1,29	150,1	3,71	12,41	145,6	10,58
derivát kvercetinu	20	<LOD	<LOD	<LOD	0,21	<LOD	<LOD
myricetin hexosid	21	<LOQ	0,34	0,45	8,19	<LOD	6,78
derivát kvercetinu	22	0,45	3,48	2,30	3,62	3,97	4,03
derivát kaempferolu	23	1,87	2,06	3,58	438,1	0,79	430,3
derivát kaempferolu	24	<LOD	<LOD	<LOQ	12,42	<LOD	12,95
derivát kaempferolu	25	<LOQ	0,37	0,15	49,75	0,29	61,55
derivát kaempferolu	26	0,21	0,54	0,19	67,09	0,44	74,83
derivát kaempferolu	27	<LOD	<LOD	<LOD	3,09	0,16	1,88
isokvercitrin	28	5,23	200,3	6,89	17,82	64,84	7,06
derivát kvercetinu	30	<LOQ	1,87	0,98	0,31	1,89	0,35
derivát kvercetinu	31	22,81	626,3	187,2	54,63	701,5	55,44
derivát kvercetinu	33	<LOD	<LOQ	<LOD	0,39	<LOD	0,39
astragalin	34	0,24	17,16	0,27	73,89	4,64	68,37
derivát kvercetinu	35	1,12	41,73	9,41	2,96	30,06	1,70
derivát kvercetinu	36	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ
derivát kaempferolu	37	0,25	69,40	1,37	35,15	91,14	41,97
derivát kvercetinu	38	2,20	27,22	9,03	6,48	33,58	7,60

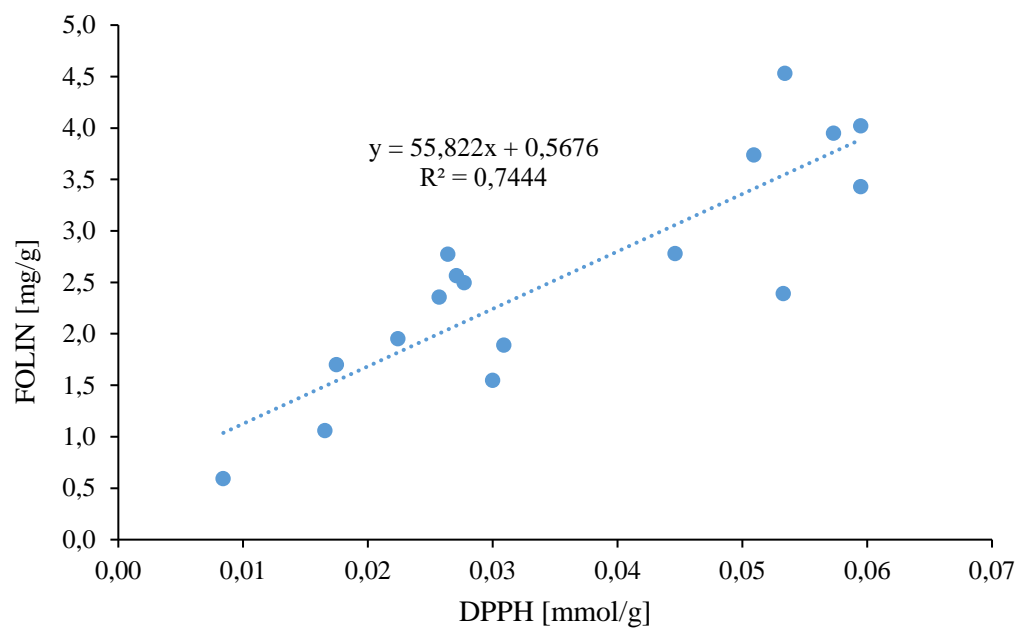
Tabulka P7: Zastoupení jednotlivých látek v extraktech připravených z mražených vzorků s
přídavkem kyseliny mravenčí, koncentrace µg/g.

LÁTKA	ČÍSLO	VZOREK					
		L2c	L2d	Ž2c	Ž2d	Č2c	Č2d
kyselina chinová	1	9,20	15,42	7,37	8,56	21,38	34,42
derivát kyseliny chinové	2	672,9	427,9	19,94	17,26	47,55	111,3
derivát kyseliny chinové	3	165,3	121,6	11,56	7,56	18,54	31,31
glukotropaeolin	4	191,4	51,73	347,0	145,2	98,81	30,19
kyselina kaffeoylchinová	5	0,41	0,45	1,62	1,67	0,46	0,50
kyselina neochlorogenová	6	7,00	7,24	26,22	23,22	7,19	8,44
kyselina kumaroylchinová	7	<LOQ	0,57	51,22	52,02	5,84	6,46
kyselina kumaroylchinová	8	0,44	0,68	64,93	61,07	13,46	14,14
kyselina chlorogenová	9	803,9	771,1	86,40	84,92	127,00	155,8
kyselina kaffeoylchinová	11	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
kyselina kumaroylchinová	12	1,06	1,61	2,19	2,18	1,21	1,32
derivát kvercetinu	14	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	1,98	2,69
derivát kaempferolu	15	<LOD	<LOD	0,24	0,16	17,29	15,54
kyselina kumaroylchinová	16	1,37	1,88	2,47	2,22	1,72	1,49
kyselina kumaroylchinová	17	63,55	147,4	22,70	25,58	22,25	23,16
derivát kvercetinu	18	95,39	77,50	15,37	18,15	71,72	68,83
kyselina kumaroylchinová	19	85,69	161,4	31,42	31,35	20,82	20,30
derivát kvercetinu	20	<LOD	<LOD	0,32	0,30	<LOQ	<LOQ
myricetin hexosid	21	0,88	0,21	11,46	9,95	5,41	6,52
derivát kvercetinu	22	15,45	14,59	8,00	9,31	15,42	17,04
derivát kaempferolu	23	4,79	3,04	106,2	109,1	680,8	718,4
derivát kaempferolu	24	0,12	<LOQ	2,73	2,72	19,95	20,65
derivát kaempferolu	25	0,66	0,60	33,35	38,04	41,10	48,15
derivát kaempferolu	26	0,86	0,90	47,45	48,24	50,69	64,88
derivát kaempferolu	27	<LOQ	<LOQ	1,85	1,61	0,93	0,87
isokvercitrin	28	124,32	49,23	5,04	5,17	9,99	11,37
derivát kvercetinu	30	1,65	1,75	0,74	0,73	0,81	0,79
derivát kvercetinu	31	1215,4	1216,9	126,2	118,5	152,9	140,4
derivát kvercetinu	33	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ	0,35	0,41
astragalín	34	5,82	2,09	83,00	85,50	13,46	12,25
derivát kvercetinu	35	130,4	111,3	3,78	3,61	5,31	4,90
derivát kvercetinu	36	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
derivát kaempferolu	37	133,1	115,2	111,6	123,9	29,27	33,43
derivát kvercetinu	38	77,82	61,72	9,44	9,25	10,15	10,87

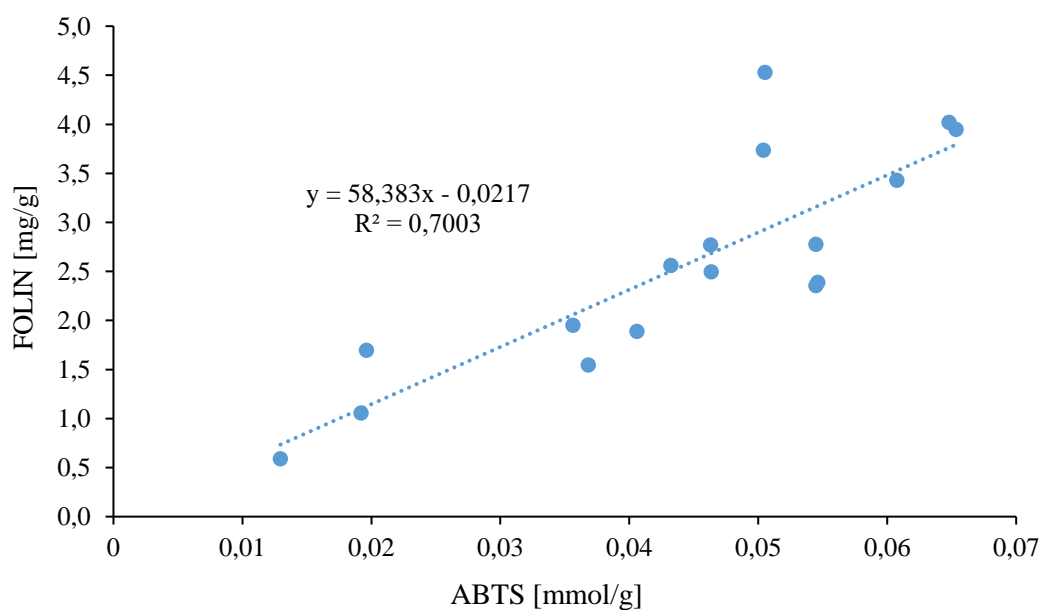
Tabulka P8: Zastoupení jednotlivých látek v mražených vzorcích po maceraci, koncentrace $\mu\text{g/g}$.

LÁTKA	ČÍSLO	VZOREK		
		B1a	L1a	Č1a
kyselina chinová	1	1,13	2,92	3,98
derivát kyseliny chinové	2	85,57	83,80	41,40
derivát kyseliny chinové	3	31,80	23,72	12,79
glukotropaeolin	4	1397,9	711,9	858,1
kyselina kaffeoylchinová	5	<LOD	<LOQ	1,64
kyselina neochlorogenová	6	<LOD	2,70	34,61
kyselina kumaroylchinová	7	<LOD	<LOQ	24,56
kyselina kumaroylchinová	8	<LOQ	<LOQ	52,22
kyselina chlorogenová	9	16,94	433,3	98,01
kyselina kaffeoylchinová	11	<LOD	1,76	<LOD
kyselina kumaroylchinová	12	<LOD	0,51	6,22
derivát kvercetinu	14	<LOD	<LOD	2,98
derivát kaempferolu	15	<LOD	<LOD	13,55
kyselina kumaroylchinová	16	<LOD	0,56	7,20
kyselina kumaroylchinová	17	0,52	21,78	18,24
derivát kvercetinu	18	3,03	9,46	21,44
kyselina kumaroylchinová	19	0,75	32,42	17,84
derivát kvercetinu	20	<LOD	<LOD	0,29
myricetin hexosid	21	<LOD	<LOQ	11,09
derivát kvercetinu	22	0,39	2,70	4,47
derivát kaempferolu	23	0,57	0,79	483,9
derivát kaempferolu	24	<LOD	<LOD	12,27
derivát kaempferolu	25	<LOQ	0,17	60,68
derivát kaempferolu	26	<LOQ	0,19	75,03
derivát kaempferolu	27	<LOD	<LOD	3,36
isokvercitrin	28	1,19	70,09	9,35
derivát kvercetinu	30	<LOQ	1,97	0,39
derivát kvercetinu	31	14,26	780,1	73,69
derivát kvercetinu	33	<LOD	<LOD	0,30
astragalin	34	<LOD	3,06	60,08
derivát kvercetinu	35	0,94	77,26	4,09
derivát kvercetinu	36	<LOD	<LOD	<LOD
derivát kaempferolu	37	0,17	53,36	46,79
derivát kvercetinu	38	4,48	79,49	9,70

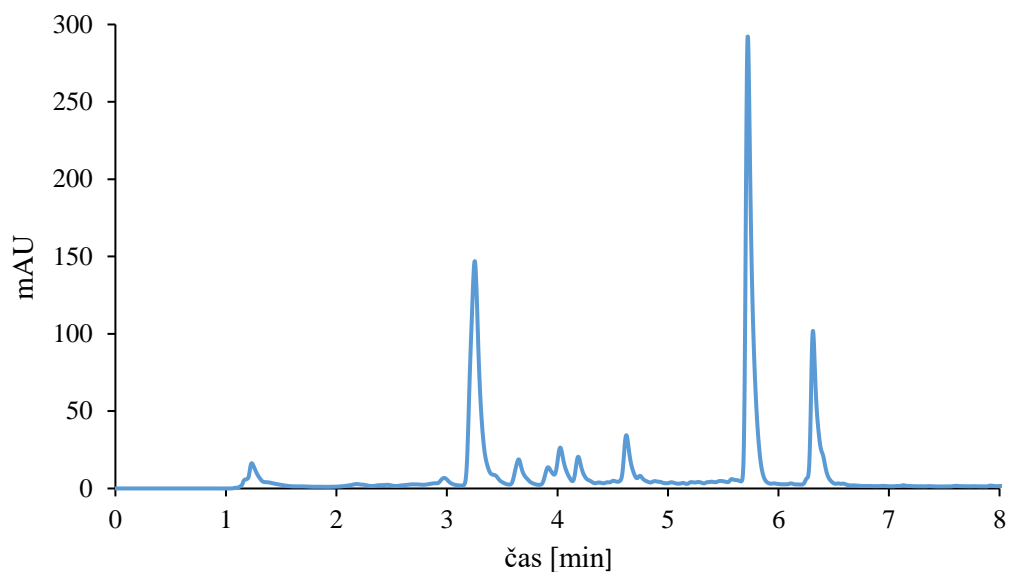
OBRÁZKY



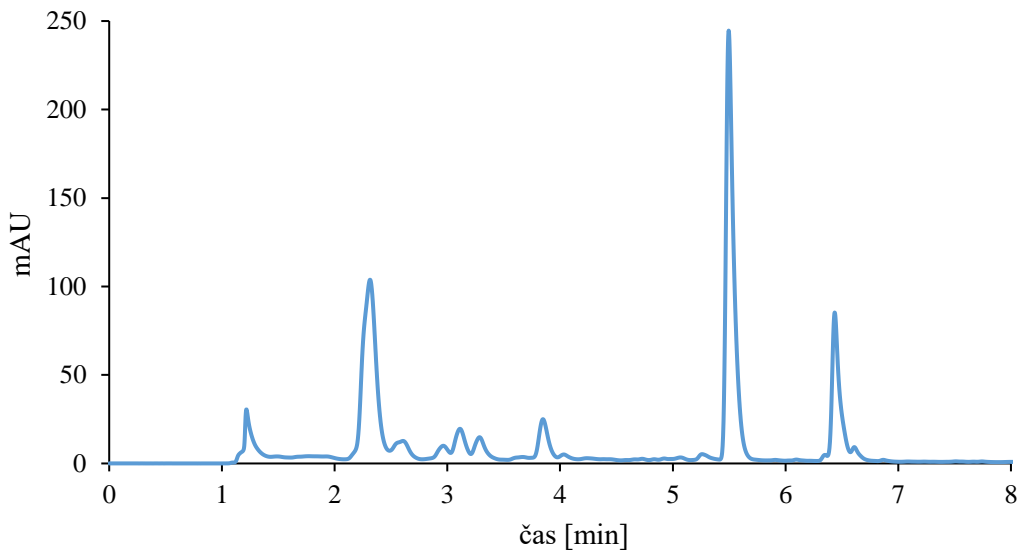
Obrázek P1: Závislost mezi celkovým obsahem fenolických látek a celkové antioxidační aktivity stanovené metodou DPPH.



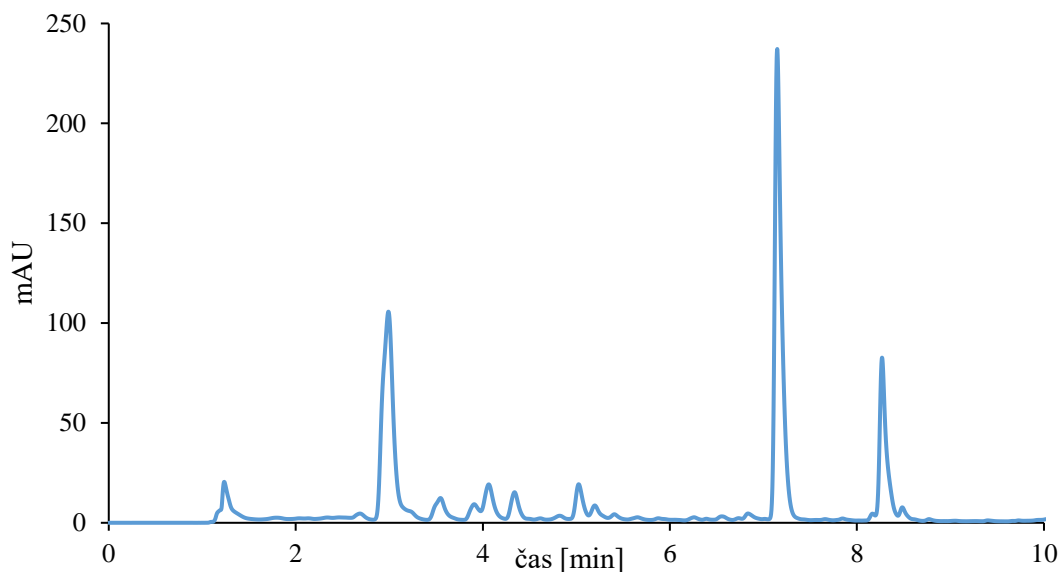
Obrázek P2: Závislost mezi celkovým obsahem fenolických látek a celkové antioxidační aktivity stanovené metodou ABTS.



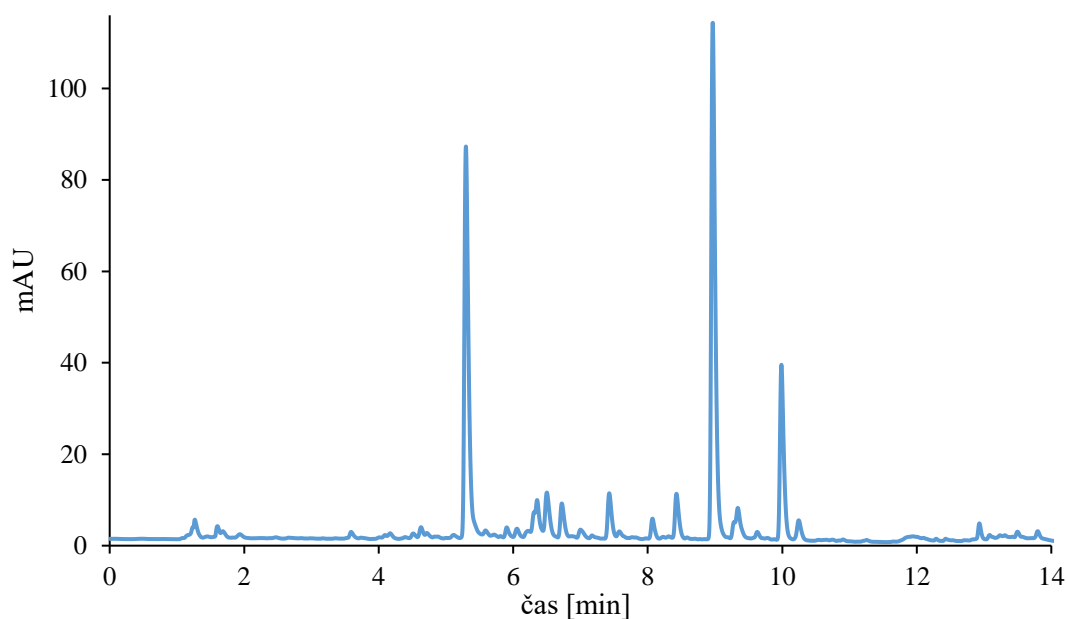
Obrázek P3: Separace látek na koloně **Ascentis Express C18** (150×3 mm, $2,7 \mu\text{m}$), mobilní fáze: MeOH/H₂O+HCOOH (0,3 %), gradientová eluce 20-100 % MeOH za 10 minut, průtok: 0,5 ml/min, teplota kolony: 30°C, dávkování: 2 μl , detekce: 280 nm.



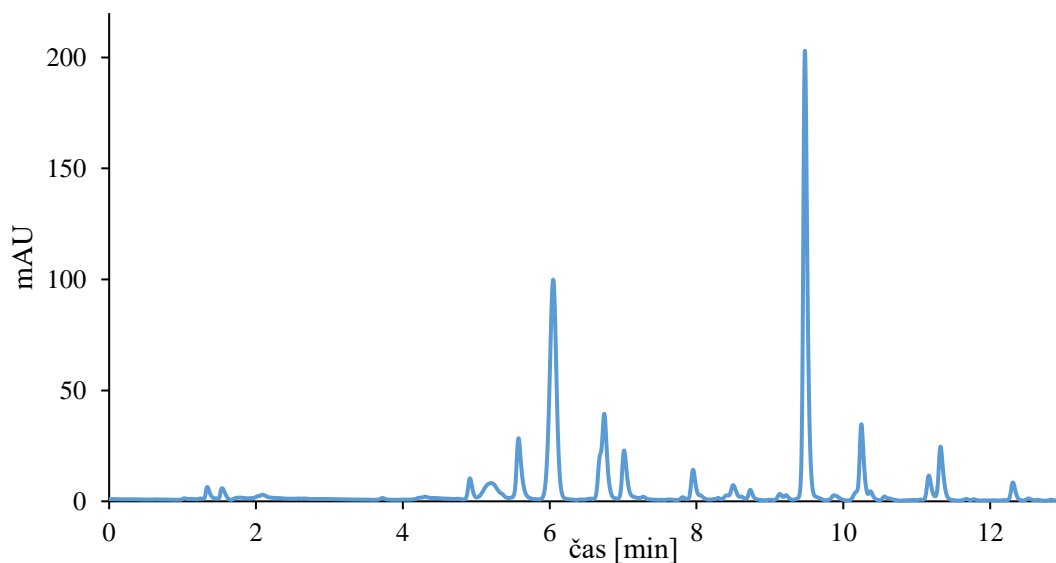
Obrázek P4: Separace látek na koloně **Ascentis Express C18** (150×3 mm, $2,7 \mu\text{m}$), mobilní fáze: MeOH/H₂O+HCOOH (0,3 %), gradientová eluce: 30-80 % MeOH za 10 minut, průtok: 0,5 ml/min, teplota kolony: 30°C, dávkování: 2 μl , detekce: 280 nm.



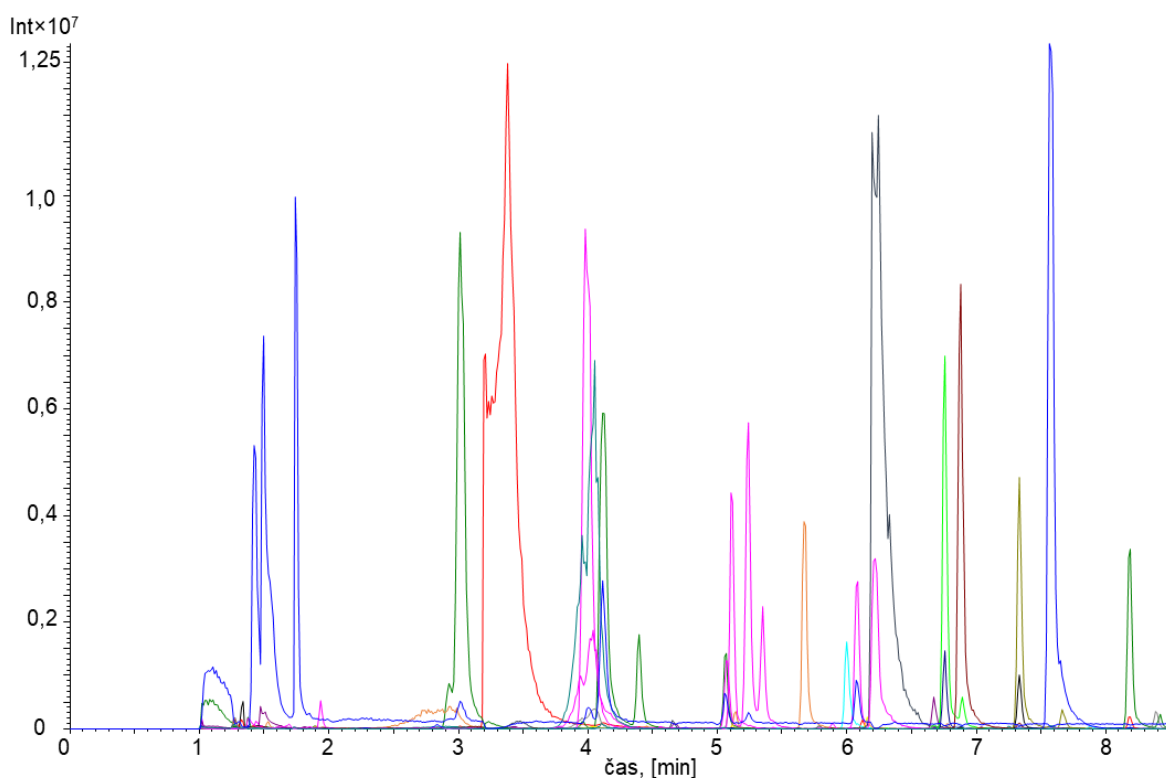
Obrázek P5: Separace látek na koloně **Ascentis Express C18** (150×3 mm, $2,7 \mu\text{m}$), mobilní fáze: MeOH/H₂O+HCOOH (0,3 %), gradient: 0 min-25 % MeOH, 8 min-60 % MeOH, 10 min-100 % MeOH, průtok: 0,5 ml/min, teplota kolony: 30°C, dávkování: 2 μl , detekce: 280 nm.



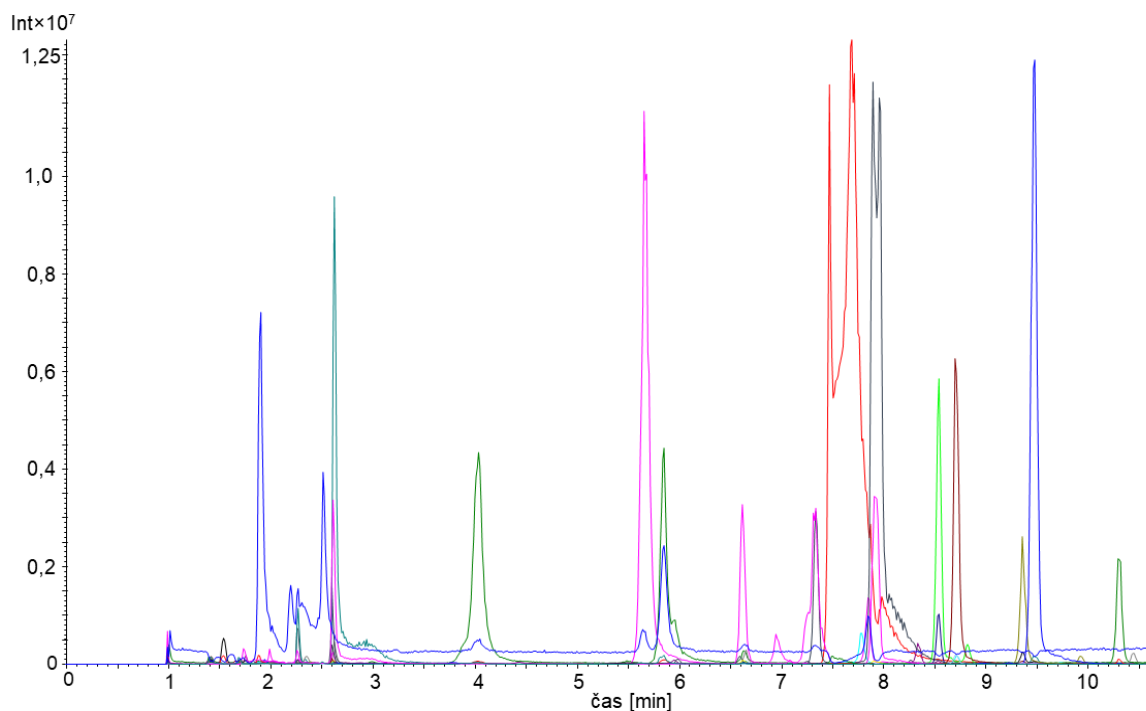
Obrázek P6: Separace látek na koloně **Ascentis Express C18** (150×3 mm, $2,7 \mu\text{m}$), mobilní fáze: ACN/H₂O+HCOOH (0,3 %), gradient: 0 min-5 % ACN, 10 min-30 % ACN, 12 min-100 % ACN, průtok: 0,5 ml/min, teplota kolony: 30°C, dávkování: 2 μl , detekce: 280 nm.



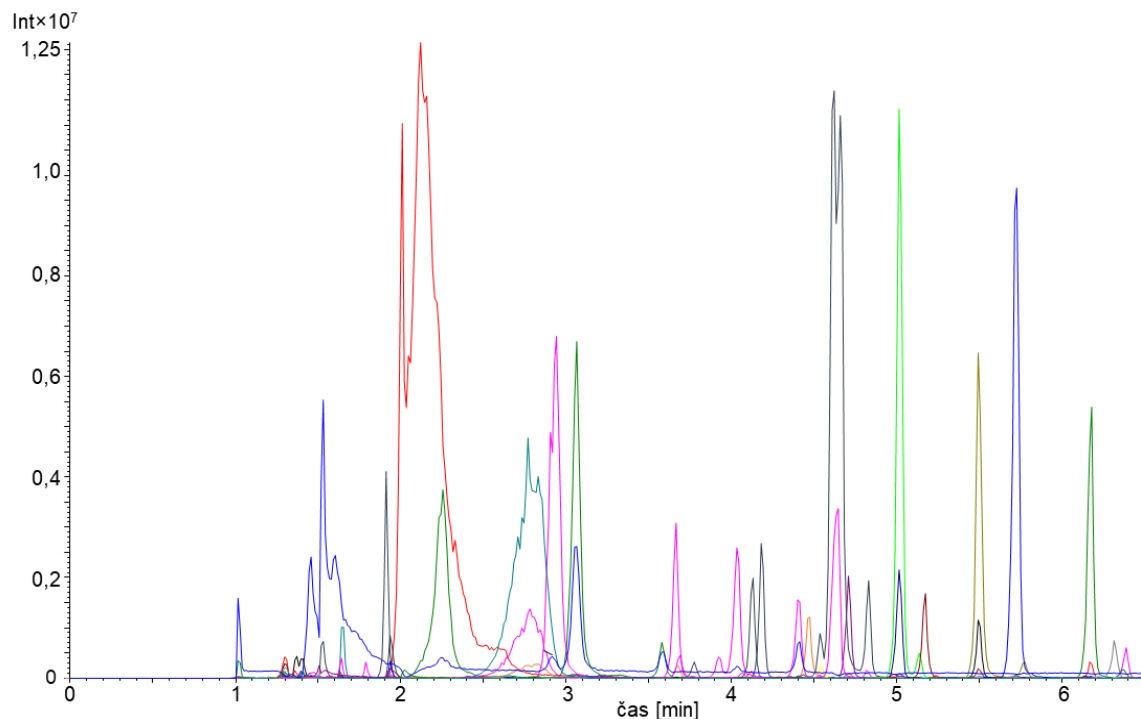
Obrázek P7: Separace látek na koloně **Luna Omega PS** (C18, 150 × 3 mm, 5 μm), mobilní fáze: ACN/H₂O+HCOOH (0,3 %), gradient: 0 min-5 % ACN, 15 min-40 % ACN, průtok: 0,5 ml/min, teplota kolony: 30°C, dávkování: 2 μl, detekce: 280 mn.



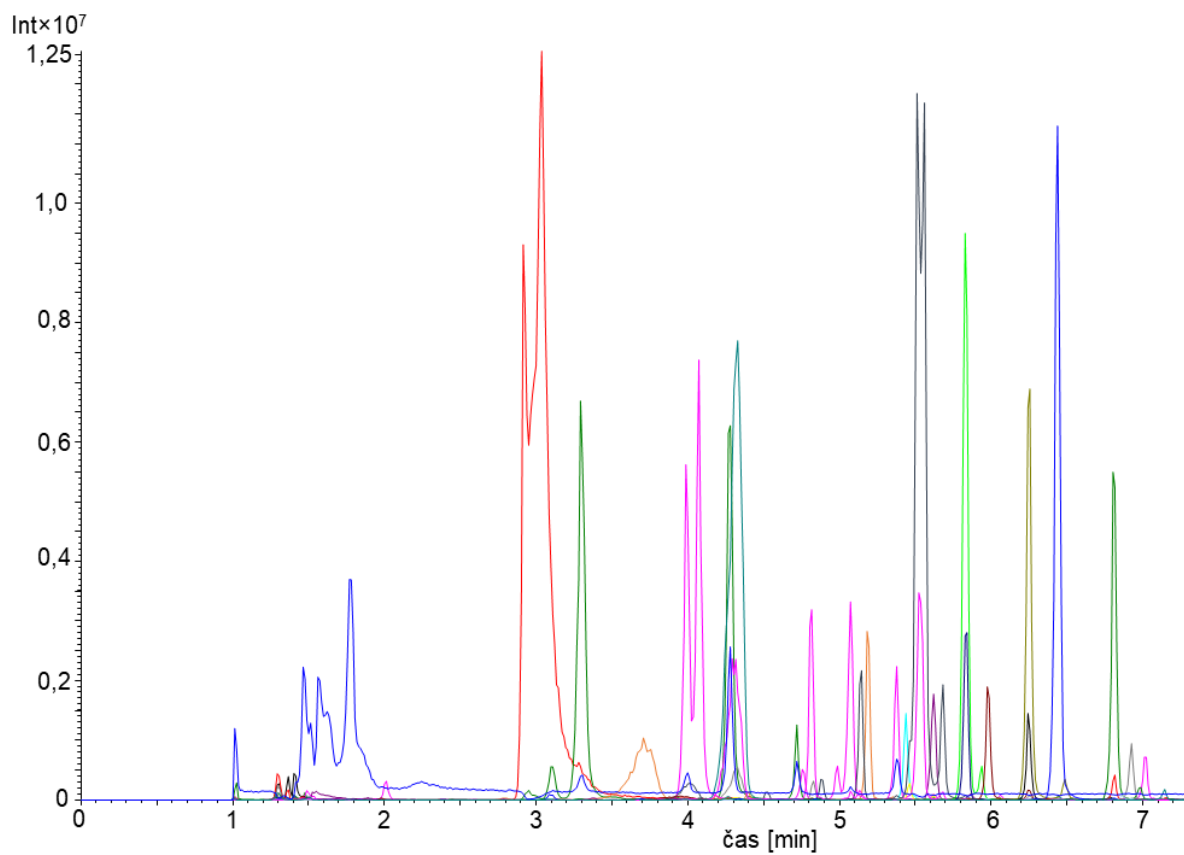
Obrázek P8: Separace látek na koloně **Ascentis Express C18** (150 × 3 mm, 2,7 μm), mobilní fáze: ACN/ H₂O (pH 2,4), gradient: 0 min-10 % ACN, 10 min- 40 % ACN, 11 min-70 % ACN, průtok: 0,5 ml/min, teplota kolony: 30°C, dávkování: 2 μl, detekce: ESI/SIM.



Obrázek P9: Separace látek na koloně **Luna Omega PS** (C18, 150 × 3 mm, 5 μm), mobilní fáze: ACN/H₂O (pH 2,4), gradient: 0 min-10 % ACN, 10 min- 40 % ACN, 11 min-70 % ACN, průtok: 0,5 ml/min, teplota kolony: 30°C, dávkování: 2 μl, detekce: ESI/MS.



Obrázek P10: Separace látek na koloně **Kinetex Polar C18** (150 × 3 mm, 2,6 μm), mobilní fáze: ACN/H₂O (pH 2,4), gradient: 0 min-15 % ACN, 5 min-36 % ACN, 6 min-50 % ACN, 7 min- 15 % ACN, průtok: 0,5 ml/min, teplota kolony: 30°C, dávkování: 2 μl, detekce: ESI/MS.



Obrázek P11: Separace látek na koloně **Kinetex Polar C18** (150×3 mm, $2,6 \mu\text{m}$), mobilní fáze: ACN/ H_2O (pH 2,4), gradient: 0 min-10 % ACN, 5 min-35 % ACN, 6 min-50 % ACN, 7 min-10 % ACN, průtok: 0,5 ml/min, teplota kolony: 30°C , dávkování: $2 \mu\text{l}$, detekce: ESI/MS.