



UNIVERZITA KARLOVA
Farmaceutická fakulta
v Hradci Králové



VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOČNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.



Metodika pro identifikaci a detekci bioaktivních látek v rostlinných částech ovocných stromů a odpadní biomase

Anežka Adamcová a kol.



CERTIFIKOVANÁ
METODIKA
2021



UNIVERZITA KARLOVA
Farmaceutická fakulta
v Hradci Králové



VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.



METODIKA PRO IDENTIFIKACI A DETEKCI BIOAKTIVNÍCH LÁTEK V ROSTLINNÝCH ČÁSTECH OVOCNÝCH STROMŮ A ODPADNÍ BIOMASE

Anežka Adamcová a kol.

CERTIFIKOVANÁ METODIKA
2021

Autorský kolektiv:**UNIVERZITA KARLOVA, FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ,****Katedra analytické chemie**

Mgr. Anežka Adamcová, doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D., Mgr. Slavomíra Zatrochová,
Mgr. Marcela Hollá, Mgr. Karolína Šírová, Bc. Kristýna Šilhavá

VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.

RNDr. Aneta Bílková, Ing. Pavlína Knapová

RADANAL s.r.o.**Název:**

Metodika pro identifikaci a detekci bioaktivních látek v rostlinných částech ovocných stromů a odpadní biomase

Vydala:**UNIVERZITA KARLOVA, FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ,**

Katedra analytické chemie, Akademika Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové

Vydáno v roce 2021

Vydáno bez jazykové úpravy.

Kontakt na vedoucího autorského kolektivu: adamcoa1@faf.cuni.cz

Foto: Mgr. Anežka Adamcová

Oponenti:**Odborný oponent z oboru:**

doc. Ing. Petr Kačer, Ph.D. – Česká zemědělská univerzita v Praze

Oponent ze státní správy:

Bc. Tomáš Jan – Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Ministerstvo zemědělství ČR schválilo publikaci jako certifikovanou metodiku a doporučilo ji pro využití v zemědělské praxi. Publikaci bylo uděleno Osvědčení číslo 12365/2021-MZE-18140 v souladu s podmínkami „Metodiky hodnocení výsledků výzkumu a vývoje“.

Certifikovaná metodika vznikla za finanční podpory Technologické agentury TAČR a je výstupem řešení projektu TJ02000196 „Výzkum využití odpadů z ovocných stromů jako zdroje cenných bioaktivních látek“.

© UNIVERZITA KARLOVA, FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ, 2021

ISBN 978-80-906644-7-0

OBSAH

ANOTACE	7
ANNOTATION	7
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	8
1. ÚVOD	9
2. CÍL METODIKY	9
3. VLASTNÍ POPIS METODIKY	10
3.1. Fenolické látky a antioxidanty	10
3.1.1. Stanovení a HPLC separace fenolických látek	10
3.1.2. Hlavní stanovované fenolické látky a jejich zdravotní přínos	12
3.1.3. Analyzované vzorky	13
3.1.4. Chemikálie a činidla	14
3.1.5. Příprava vzorků	14
3.2. Chemická analýza fenolických látek z biomasy	14
3.2.1. HPLC-DAD	14
3.2.2. Průtoková metoda pro stanovení celkové antioxidační aktivity	15
3.3. Validační parametry	15
3.3.1. Validační parametry HPLC metody pro separaci fenolických látek v jabloni	16
3.3.1.1. Příklad chromatogramu - jabloň	17
3.3.2. Validační parametry HPLC metody pro separaci fenolických látek v hrušni	18
3.3.2.1. Příklad chromatogramu - hrušeň	19
3.4. Výsledky	20
3.4.1. Jabloň	21
3.4.1.1. Sledování fenolického profilu v jednotlivých odrůdách jabloní	21
3.4.1.1.1. 'Topaz'	21
3.4.1.1.2. 'Golden Delicious'	22
3.4.1.1.3. 'Angold'	23
3.4.1.1.4. 'Meteor'	24
3.4.1.1.5. 'Melrose'	25
3.4.1.1.6. 'Fuji'	26

3.4.1.1.7. 'Braeburn'	27
3.4.1.1.8. 'Lady Silvia'	28
3.4.1.1.9. 'Rubinstep'	29
3.4.1.1.10. 'Rubin'	30
3.4.1.1.11. Štěpka jabloní.....	31
3.4.1.1.12. Sledování změn v celkové antioxidační aktivitě v jednotlivých materiálech jabloně	32
3.4.2. Hrušeň	34
3.4.2.1. Sledování fenolického profilu v jednotlivých odrůdách hrušní	34
3.4.2.1.1. 'Clapova'	34
3.4.2.1.2. 'Konference'	35
3.4.2.1.3. 'Williamsova červená'	36
3.4.2.1.4. 'Williamsova'	37
3.4.2.1.5. 'Charneuská'	38
3.4.2.1.6. 'Lucasova'	39
3.4.2.1.7. 'Highland'	40
3.4.2.1.8. 'Grosdemange'	41
3.4.2.1.9. 'Thirriotova'	42
3.4.2.1.10. 'General Leclerc'	43
3.4.2.1.11. Štěpka hrušní.....	44
3.4.2.1.12. Sledování změn v celkové antioxidační aktivitě v jednotlivých materiálech hrušní.....	45
3.5. Komentáře k získaným výsledkům	47
3.5.1. Jabloň	47
3.5.2. Hrušeň	47
4. ZÁVĚR	47
5. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPU.....	48
6. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY	48
7. EKONOMICKÉ ASPEKTY	49
8. ZDROJE	50

ANOTACE

Metodika je určena všem pěstitelům ovocných stromů, producentům potravních doplňků a kosmetických preparátů i zájemcům věnujícím se trendům v oblasti agrikultury či zdravého životního stylu. Jsou uvedeny metody pro stanovení fenolických látek, včetně přípravy vzorků, podmínek separace a stanovení celkové antioxidační aktivity.

Hlavním zájmem předložené metodiky je stanovení fenolických látek v různých odrůdách ovocných stromů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Sledovaným materiálem jsou listy, kůra, pupeny, květy a štěpka. Cílem bylo vyvinutí dvou rutinních, jednoduchých a validovaných HPLC metod pro separaci hlavních fenolických látek v jabloních (floridzin, floretin, kyselina chlorogenová, rutin a kvercitrin) a hrušních (arbutin, kyselina chlorogenová, 1,5- dikafeoylchinová kyselina, 3,5- dikafeoylchinová kyselina a rutin) za použití detektoru diodového pole (DAD). Součástí metodiky je i aplikace obou metod na široké spektrum vzorků pro sledování měnícího se fenolického profilu v rámci vegetačního období v jednotlivých částech stromů a stanovení celkové antioxidační aktivity ve všech připravených extraktech pomocí metody průtokové injekční analýzy.

Metodika je dále doplněna informacemi o zdravotních přínosech hlavních fenolických látek vyskytujících se v rostlinné biomase jabloní a hrušní. Ze získaných výsledků jsou doporučeny snadno dostupné odpadní materiály z ovocných stromů pro následnou recyklaci a další využití, a vybrány odrůdy s vysokým obsahem zdraví prospěšných bioaktivních látek.

ANNOTATION

The described methodology is intended for use of fruit trees growers, fruit processing units, producers of food supplements or cosmetics and those who are interested in current trends in agriculture or healthy lifestyle. The methodology includes analytical methods used to determinate phenolic substances including sample preparation, separation conditions, and determination of total antioxidant activity.

The main interest of the presented methodology is to determine phenolic compounds in various cultivars of fruit trees with using high performance liquid chromatography (HPLC). The studied material includes leaves, bark, buds, flowers and woodchip. The aim was to develop routine, simple and validated HPLC methods to separate main phenolic compounds in apples (phloridzin, phloretin, chlorogenic acid, rutin and quercitrin) and pear (arbutin, chlorogenic acid, 1,5 and 3,5-di-caffeoylquinic acid, and rutin) trees with using diode array detector (DAD). The methodology also includes the application of abovementioned methods to a wide range of samples to monitor the changing phenolic profile in individual parts of trees during vegetation period and to determine the total antioxidant activity in all prepared extracts with using flow injection analysis.

The methodology also contains information about health benefits of the main phenolic substances occurring in the plant material of apple and pear trees. From the obtained results, materials from fruit trees and selected varieties with high content of healthy bioactive substances are recommended for subsequent recycling.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACN.....	acetonitril
CQA.....	kafeoylchinová kyselina
DAD	detektor s diodovým polem
DCQA	dikafeoylchinová kyselina
ECD	elektrochemický detektor
ČSÚ	Český statistický úřad
G6P	glukóza-6-fosfatáza
FaF UK.....	Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy
FIA.....	průtoková injekční analýza
FLD.....	fluorescenční detektor
HPLC.....	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
MeOH.....	metanol
MS	hmotnostní spektrometrie
OGTT	orální glukózový toleranční test
PTFE.....	polytetrafluorethylen
RPM	otáčky za minutu
RSD	relativní směrodatná odchylka
SD.....	směrodatná odchylka

1. ÚVOD

Fenolické látky jsou sekundární metabolity rostlin a patří do skupiny přírodních antioxidantů. Od nepaměti tvoří nezbytnou součást lidské výživy. Jejich pravidelný příjem přispívá ke snížení rizika karcinogeneze, kardiovaskulárních chorob, neurodegenerativních onemocnění a chrání tělo proti infekcím. Fenolické sloučeniny se nachází v různých částech rostlin a kromě plodů je lze nalézt i v materiálu ovocných stromů.

Ovocné stromy, především jabloně a hrušně, patří mezi nejoblíbeněji pěstované dřeviny zejména u malospotřebitelů ovoce a zahrádkářů. Zatímco složení plodů je již dlouhodobě známo, tato certifikovaná metodika obsahuje cenné informace o zastoupení a množství fenolických látek v materiálu ovocných stromů – listí, kůře, pupenech, květech a štěpce. Tento materiál obsahuje vysoký obsah fenolických látek a jiných antioxidačních látek, který je mnohdy řádově vyšší než obsah těchto látek v ovoci. Tento doposud nevyužívaný a hojně se vyskytující zemědělský materiál by tak mohl sloužit k recyklaci jako zdroj cenných bioaktivních látek s případným uplatněním v kosmetickém, potravinářském a farmaceutickém průmyslu.

Pro stanovení fenolických látek se často v praxi využívá technika vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), která umožňuje separaci a následnou kvantifikaci fenolických látek. Pro stanovení celkové antioxidační aktivity ve sledovaných extraktech lze využít metodu průtokové injekční analýzy.

2. CÍL METODIKY

Metodika se zabývá stanovením fenolických látek v různých odrůdách ovocných stromů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Sledovaným materiálem jsou listy, kůra, pupeny, květy a odpadní štěpka. Cílem metodiky bylo vyvinout dvě rutinní, jednoduché a validované HPLC metody pro separaci hlavních fenolických látek v jabloních (floridzin, floretin, kyselina chlorogenová, rutin a kvercitrin) a hrušních (arbutin, kyselina chlorogenová, 1,5- dikafeoylchinová kyselina, 3,5- dikafeoylchinová kyselina a rutin). K detekci byl využit vzhledem ke spektrálním vlastnostem analyzovaných látek spektrofotometrický detektor. Dalším úkolem byla aplikace vyvinutých HPLC metod pro sledování měnícího se fenolického profilu v dostupném materiálu ovocných stromů v rámci vegetačního období (jaro – podzim) a v připravených extraktech sledovat celkovou antioxidační aktivitu pomocí metody průtokové injekční analýzy. Součástí metodiky je i uvedení přínosů analyzovaných látek a možnosti dalšího využití sledovaného materiálu.

3. VLASTNÍ POPIS METODIKY

3.1. Fenolické látky a antioxidanty

Fenolické látky tvoří velkou skupinu sloučenin s různou strukturou. Nachází se v různých rostlinných druzích a množství fenolických látek se liší v různých částech rostlin. Zdrojem těchto látek pro člověka jsou především ovoce a zelenina. Lze je rozdělit do tří základních skupin: neflavonoidní, flavonoidní a ostatní. Jedná se o organické látky, které obsahují minimálně jedno aromatické jádro a hydroxylové skupiny [1, 2].

Rozsáhlou skupinu tvoří flavonoidy, jejichž základní strukturou je flavan. Ten se skládá ze dvou benzenových jader spojených třemi uhlíky a ty spolu s kyslíkem tvoří heterocyklus (2H-pyran). Flavonoidy jsou dle struktury klasifikovány do několika skupin: katechiny, leukoanthokyanidiny, flavanony, flavanonoly, flavony, flavonoly, anthokyanidiny, isoflavonoidy, dále pak chalkony a dihydrochalkony, auryony [1, 2].

Fenolické látky a flavonoidy patří do skupiny přírodních antioxidantů, které mají významný vliv na lidské zdraví, jako je například schopnost eliminovat negativní účinky volných radikálů v krvi, inhibice oxidace lipidů (reagují s hydroperoxidovým volným radikálem na málo reaktivní hydroperoxid, tím přeruší řetězovou radikálovou reakci). Antioxidanty také ovlivňují i procesy regulace krevního tlaku a hladiny glukosy v krvi. Mají i protinádorové, antimikrobiální a protizánětlivé vlastnosti [4].

3.1.1. Stanovení a HPLC separace fenolických látek

Rostlinný materiál a jejich extrakty obsahují různé fenolické látky a mnoho jiných komponent. K analýze takto složitých směsí je často využívána vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), která separuje sloučeniny na jednotlivé frakce. Systém kapalinové chromatografie se skládá z mobilní fáze, tvořenou organickou složkou (metanol, acetonitril) a vodnou složkou (okyselenou často kyselinou fosforečnou, octovou, mravenčí). Okyselení přispívá ke snížení ionizace fenolických látek a zvýšení jejich retence na koloně. Téměř vždy je při separaci využita gradientová eluce.

K samotné separaci dochází v koloně (100 – 300 mm; vnitřní průměr 2,1, 3,0 a 4,6 mm) naplněné částicemi s reverzní stacionární fází. Nejčastěji jsou využívány částice silikagelu modifikované funkčními skupinami (C18, C8, NH₂). Částice mohou být plně porézní či povrchově porézní.

Nejčastějším typem detekce je spektrofotometrická detekce pomocí detektoru diodového pole (DAD), který umožňuje analýzu fenolických látek obsahující chromoforové jádro. Fluorescenční (FLD) detektory jsou využívány u látek schopných fluorescence. Elektrochemický detektor (ECD) je používán u elektroaktivních látek. Moderním trendem je využití hmotnostně-spektrometrických detektorů (MS) [3]. Studie zaměřené na stanovení fenolických látek v materiálech rostlinného původu jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Přehled separačních podmínek pro stanovení fenolických látek z předešlých studií

Vzorek	Stanovované látky	Mobilní fáze	Typ kolony	Detekce	Zdroj
Plody hrušky	kyselina chlorogenová, rutin, kvercetin-3-O-galaktosid, isokvercitrin, isorhamnetin rutinosid, kvercitrin, kvercitrin malonyl glukosid a isorhamnetin glukosid	H ₂ O + 0,05% CF ₃ COOH, ACN	ACE (3 µm, C18, 150 × 4,6 mm) předkolona ACE (3 µm, C18)	PDA	[5]
Slupka a dužina plodů hrušní	arbutin, derivát tryptofanu, kyselina 3- kafeoylchinová, dimery prokyanidinu, katechin, kyselina 5- kafeoylchinová, coumaroyl hexosid kyseliny jablečné, kyselina 4- kafeoylchinová, epikatechin, kyselina coumaroylchinová, kyanidin-3-O-hexosid, hexosid kyseliny syringové, peonidin-3-O-hexosid, kyselina kumarová, kvercetin-3-O-rutinosid, kvercetin-3-O-galaktosid, kvercetin-3-O-glukosid, di-O-kafeoylchinová kyselina, isorhamnetin-3-O-rutinosidy, isorhamnetin-3-O-hexosidy a isorhamnetin acetyl hexosidy	H ₂ O + 1% HCOOH, ACN	Lichrospher RP-18, 5 µm s předkolonou ze stejného materiálu	DAD a ESI/MS-MS	[6]
Listy hrušní	arbutin, deriváty arbutinu, hydroxykřovičová kyselina, chlorogenová kyselina, p-kumarová kyselina, deriváty kyseliny p-kumarové a flavonolové glykosidy	H ₂ O + 5% HCOOH, MeOH	Shandon Hypersil ODS (3 µm, RP, 250 × 4 mm)	DAD	[7]
Plody jabloně	Prokyanidin B1, katechin, chlorogenová kyselina, Prokyanidin B2, kvercetin-3-O-glukosid, isokvercitrin, rutin, kvercitrin, avikularin, floridzin	H ₂ O + 2% CH ₃ COOH, ACN	YMC-Pack ODS-A C18 (250 × 4,6 mm × 5 µm) Předkolona: YMC-Triart C18 (10 × 3 mm, 5 µm)	PDA	[8]
Listy jabloní	p-hydroxybenzoová, kyselina, chlorogenová, kyselina, kvercetin-3-O-glukosid, isoquercitrin, rutin, floridzin	H ₂ O + H ₃ PO ₄ , ACN	Thermo Scientific Aquasil C18 (250 × 4,6 mm × 5 µm)	PDA	[9]
Listy jabloní	Rutin, 3-hydroxyfloridzin, floridzin, kvercetin-3-O-arabinosid	H ₂ O + 0,05% HCOOH, MeOH	Waters Acquity HSS T-3 column (100 mm × 2,1 mm, < 2 µm particle size)	PDA	[10]

3.1.2. Hlavní stanovované fenolické látky a jejich zdravotní přínos

Arbutin

Arbutin (4-hydroxyfenyl- β -D-glucopyranosid) je hydrochinonová sloučenina se dvěma epimery, α a β arbutinem. Je chemicky stabilní a může být vyroben synteticky nebo může být získán z rostlin a vykazuje antioxidační aktivitu.

Arbutin může účinně inhibovat aktivitu tyrosinázy v kožních buňkách (α -arbutin je silnějším inhibitorem) a blokovat tak tvorbu melaninu, aniž by ovlivnil buněčnou proliferaci. Kromě toho by mohl urychlit rozklad a vylučování melaninu, a tím snížit pigmentaci kůže a eliminovat pihy. Díky této své vlastnosti se používá hlavně v kosmetických přípravcích, například jako součást krémů pro zesvětlení kůže. Vzhledem k tomu vzrůstá množství výzkumů, které se zabývají účinky arbutinu při vyrovnání nestejného odstínu pleti [11].

Dále je arbutin hlavní součástí přípravků pro léčbu popálenin a opaření. Vyznačuje se rychlým odstraněním bolesti a otoků. Urychluje hojení, nezanechává žádné jizvy a může zmírnit akné. Má baktericidní a protizánětlivé účinky. Může ulevit od kašle a astmatu [11, 12].

Kyselina chlorogenová

Kyselina chlorogenová (kyselina 3- kafeoylchinová, 3-CQA) je ester tvořený kyselinou kávovou a kyselinou L-chinovou. Mezi izomery kyseliny chlorogenové patří například kyselina 4- kafeoylchinová (4-CQA) a kyselina 5- kafeoylchinová (5-CQA). Molekuly s více než jednou skupinou kyseliny kávové se označují jako isochlorogenové kyseliny (dikafeoylchinové kyseliny). Existují v několika isomerech jako jsou například kyselina 3,4- dikafeoylchinová (3,4-DCQA), kyselina 3,5- dikafeoylchinová (3,5-DCQA) a kyselina 1,5- dikafeoylchinová (1,5-DCQA) [13].

V hruškách tvoří nejdůležitější antioxidačně aktivní složku. Je potenciální chemoprotektivní látka, může podporovat prevenci chronických onemocnění, jako je rakovina, kardiovaskulární onemocnění a snižuje relativní riziko vzniku Alzheimerovy choroby. Dále může podporovat protinádorovou aktivitu, posílení imunitního systému a snížení toxických účinků chemoterapie. Mezi její další zdravotní výhody patří zlepšení vazoreaktivity, antihypertenzní účinek a inhibiční účinek na hromadění tuku. Také má antibakteriální a protizánětlivé účinky [12, 13].

Kyselina chlorogenová se podílí na snižování rizika diabetu typu 2. Má hypoglykemický účinek, díky kterému snižuje koncentraci glukózy v krvi (působí na glukóza-6- fosfatázu (G6P), enzym zasahující do kontroly krevní glukózy). Dále má stimulační účinek na transport glukózy v kosterním svalu. Stimuluje transport glukózy v kosterním svalu mechanismem nezávislým na inzulinu [14].

Rutin

Rutin (kvercetin-3-rutinosid) je bioaktivní rostlinný flavonoid. Někdy nazýván jako vitamín P. Flavonoidy jsou exogenní antioxidanty a působí v různých fázích

oxidačních procesů, včetně působení jako vychytávače radikálů, donory vodíku, donory elektronů, rozkladače peroxidů, singletové kyslíkové zhášače, inhibitory enzymů a látky chelatující kovy. Flavonoidy jsou účinné v prevenci kapilárního krvácení a křehkosti kapilár. Kromě toho má tato skupina sloučenin značně široké spektrum farmakologických vlastností, včetně antioxidačních, antialergických, protizánětlivých, antidiabetických, hepatoprotektivních, gastroprotektivních, antivirových a antineoplastických [15].

Použití rutinu je omezené, jelikož je málo rozpustný ve vodě (0,125 g/l). Používá se v potravinách v různých formách, jako jsou barviva, antioxidanty, konzervační látky, stabilizátory a absorbenty UV záření. Používá se také jako aktivní složka v různých multivitaminových přípravcích, kosmetickém a chemickém průmyslu a v krmivech pro zvířata [15, 16].

Floridzin

Floridzin (floreitin-2'-β-D-glukopyranosid) patří do skupiny flavonoidů, třídy dihydrochalkonů. Jeho aglykon se nazývá floretin. Příznivě se uplatňuje zejména při úpravě glykémie. Studie poukazují na jeho anti-hyperglykemickou aktivitu u myší [17]. Rovněž byla provedena studie u dobrovolníků, u kterých byl sledován efekt floridzinu na snížení krevní glykémie. Po provedení orálního glukózového tolerančního testu (OGTT) se současným podáním floridzinu bylo zjištěno významné snížení glykémie [18]. Tyto studie poukazují na významnou schopnost floridzinu snižovat postprandiální glukózu a zlepšit tak zdraví pacientů s diabetem.

3.1.3. Analyzované vzorky

Stanovení fenolických látek bylo provedeno u 10 odrůd jabloně a 10 odrůd hrušně. Sledovaným materiálem bylo listí, kůra, pupeny, květy a štěpka. Pro sledování měnicího se fenolického profilu byly vzorky odborně odebírány 4krát ročně s ohledem na dostupný materiál.

Rostlinný materiál jabloně byl odebrán v období březen – duben 2020, červen 2020, srpen – září 2020 a říjen – listopad 2020. Vzorky hrušně byly odebrány v období srpen – září 2019, říjen – listopad 2019, březen – duben 2020 a červen 2020.

Chemická analýza byla provedena u odrůd jabloní ('Topaz', 'Golden Delicious', 'Angold', 'Meteor', 'Melrose', 'Fuji', 'Braeburn', 'Lady Silvia', 'Rubinstep', 'Rubín') a hrušní ('Lucasova', 'Thirriotova', 'Grosdemange', 'Charneuská', 'Highland', 'Wiliamsova', 'Wiliamsova červená', 'Konference', 'Clapova', 'General Leclerc'). Ovocné stromy pocházely z výsadby Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského Holovousy, s.r.o. Ihned po odběru byly vzorky usušeny při pokojové teplotě a takto skladovány do doby zpracování. Směsný vzorek štěpky byl připraven smícháním různých odrůd jabloní ('Golden Delicious', 'Lady Silvia', 'Rubinola', 'Angold') a hrušní ('Konference', 'Clapova', 'Lucasova', 'Charneuská').

3.1.4. Chemikálie a činidla

Ve studii byly použity tyto standardy: floridzin dihydrát (99%), floretin ($\geq 99\%$), kyselina chlorogenová ($\geq 95\%$), kvercitrin ($\geq 78\%$), rutin ($> 94\%$), arbutin ($\geq 98\%$), kyselina dihydroxybenzoová (98%) od dodavatele Sigma Aldrich (Praha). Kyselina 3,5- dikafeoylchinová ($\geq 98\%$) a kyselina 1,5- dikafeoylchinová ($\geq 98\%$) byly dodány Chem Faces (China). Mezi použité rozpouštědla (kvality HPLC Gradient Grade) a chemikálie patřily kyselina mravenčí, metanol a acetonitril rovněž od dodavatele Sigma Aldrich (Praha). Ultra-čistá voda byla vyrobena přístrojem Milli-Q (Millipore, USA). Při měření celkové antioxidační kapacity (TAA) byl využit standard kyseliny dihydroxybenzoové (DHBA) od Sigma Aldrich (Praha).

3.1.5. Příprava vzorků

Rostlinný materiál ovocných stromů (listí, kůra, pupeny, květy, štěpka) byl usušen při pokojové teplotě. Listí bylo důkladně zhomogenizované pomocí mixeru a byly odstraněny přebytečné části (řapík). Ostatní vzorky byly homogenizovány ve třecí misce. Kůra byla získána sloupnutím vrchní části větvíček jednoletých obrostů. Po důkladné homogenizaci bylo na analytických váhách naváženo 0,05 g vzorku do 2 ml centrifugační eppendorf zkumavky. Následně byla provedena extrakce 2 mL metanolu s přídavkem 0,1% (v/v) mravenčí kyseliny. Následovala ultrazvuková lázeň po dobu 30 minut (s protřepáním po 10-ti minutách), centrifugace (15 minut, 5000 rpm), a filtrace přes 0,22 μm PTFE stříkačkový filtr do vialky. Do analýzy byl extrakt skladován v lednici při 4 °C.

3.2. Chemická analýza fenolických látek z biomasy

3.2.1. HPLC-DAD

Pro analýzu hlavních fenolických látek v biomase studovaných ovocných stromů byl použit HPLC systém Shimadzu LC-10 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) složený z binárního čerpadla (LC-10AD VP), autosampleru (SIL-HT A), kolonového termostatu (CTO-10A VP). Sběr a zpracování dat bylo provedeno pomocí Shimadzu "LC Lab-Solution" software (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan).

Pro separaci fenolických látek z jabloně byla použita analytická kolona YMC-Triart C18 ExRS (150 \times 4.6 mm \times 5 μm , 8 nm). Separace byla provedena s využitím lineárního gradientu v němž složka A byla ultračistá voda okyselená na pH 2,2 kyselinou fosforečnou a složka B acetonitril. Průběh gradientu byl následující: 0,01 – 10 min 10% B, 10 – 10,2 min 50% B, 10,2 – 12,5 min 90% B při průtokové rychlosti 1 ml/min a teplotě 30 °C. DAD detekce byla hodnocena při vlnových délkách: 280 nm (floridzin a floretin), 327 nm (kyselina chlorogenová), 354 nm (rutin a kvercitrin). Objem nástřiku extraktu byl 1 μl .

Pro separaci fenolických látek z hrušně byla použita analytická kolona ASCENTIS Express RP-Amide (150 \times 4.6 mm, 2.7 μm). Separace byla provedena s využitím lineárního gradientu v němž složka A byla ultračistá voda okyselená na pH 2,2

kyselinou fosforečnou a složka B acetonitril. Průběh gradientu byl následující: 0,01 – 8 min 10% B, 8 – 8,20 min 55% B, 8,20 – 10,50 min 90% B při průtokové rychlosti 1 ml/min a teplotě 30 °C. DAD detekce byla hodnocena při vlnových délkách: 220 nm (arbutin), 327 nm (kyselina chlorogenová a její deriváty), 354 nm (rutin). Objem nástřiku extraktu byl 1 µl.

Koncentrace fenolických látek byly hodnoceny na základě integrované plochy píku identifikovaného analytu v extraktu porovnáním se standardem a absorpčním spektrem.

3.2.2. Průtoková metoda pro stanovení celkové antioxidační aktivity

Pro hodnocení antioxidační aktivity odpadních produktů ovocných stromů byla použita průtoková injekční analýza (FIA) s využitím multikanálového elektrochemického detektoru CoulArray (ESA Inc., Chelmsford, MA, USA), autosampleru (Model 542 HPLC, ESA, USA), čerpadla (Model 582 ESA Inc., Chelmsford, MA). Zpracování výsledků analýzy probíhalo v programu CoulArray® for Windows®32.

Byla použita mobilní fáze fosfátového pufru o koncentraci 0,05M s přidavkem 10% acetonitrilu o celkovém pH 4,7. Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min. Nastříkovaný objem extraktu byl 5 µl. Potenciály na pracovních elektrodách aplikované proti suché referenční hydrogen-palladiové elektrodě byly 200, 400, 600 a 800 mV. Antioxidační aktivita byla spočítána integrací plochy píků odezvy na potenciálech 200, 400, 600 a 800 mV. Nejprve byl vypočten náboj při jednotlivých potenciálech a následně celkový náboj vztažený na navážku při zohlednění ředění (20x) a objemu nástřiku.

Pro kontrolu správnosti měření a funkčnosti senzoru byla před každou sadou provedena kalibrace pomocí roztoků kyseliny dihydroxybenzoové (DHBA) o koncentracích 1 – 5 µg/ml.

3.3. Validační parametry

Mezi stanovované validační parametry u obou metod pro separaci fenolických látek ovocných stromů patřily: linearita, výtěžnost, přesnost a opakovatelnost. Linearita a opakovatelnost byla provedena na směsném roztoku standardů. Výtěžnost a přesnost byla provedena na reálných extraktech listů. U obou metod byly stanoveny testy vhodnosti chromatografického systému. Byl proveden třikrát nástřik směsného roztoku standardů. Vyvinutá metoda byla charakterizována následujícími parametry: retenční čas (tR), rozlišení chromatografických píků (RS), šířka píku v 50% výšky (w50), píková kapacita (Pc) a faktor symetrie (AS).

U metody pro separaci fenolických látek z jabloně byl lineární rozsah testován v rozsahu 2 – 250 mg/l pro floretin, kyselinu chlorogenovou, rutin, kvercitrin a 1000 – 8000 mg/l pro floridzin.

U metody pro separaci fenolických látek z hrušně byl lineární rozsah testován v rozsahu 2,5 – 250 mg/l pro rutin, 1,5-DCQA a 3,5-DCQA a 100 – 1250 mg/l pro arbutin a kyselinu chlorogenovou.

U obou metod bylo vyhodnocení provedeno pomocí lineární regrese a metody nejmenších čtverců pro kalibrační závislost plochy píku dané látky na koncentraci. Testované kalibrační rozsahy odpovídaly očekávanému obsahu analyzovaných látek v extraktech. Každý bod kalibrační křivky byl změřen třikrát a pro vyhodnocení byla použita průměrná hodnota plochy.

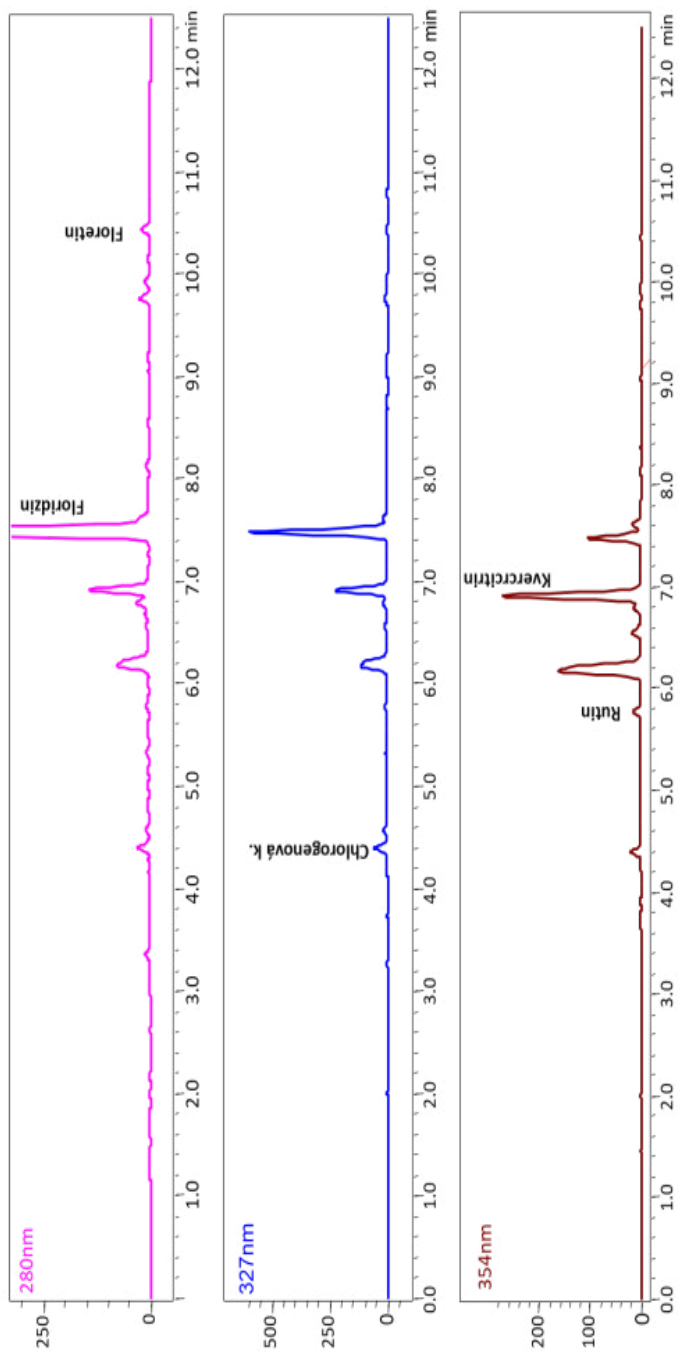
3.3.1. Validační parametry HPLC metody pro separaci fenolických látek v jabloni

Tabulka 2: Validační parametry Jablůň: Test vhodnosti chromatografického systému, linearita, výtěžnost, přesnost, opakovatelnost

Test vhodnosti systému					
	Floridzin	Floretin	Chlorogenová k.	Rutin	Kvercitrin
t_R	7,45	10,38	4,35	5,76	6,89
A_S	1,19	1,19	1,15	1,25	1,23
R_S	4,34	22,23	21,20	10,58	8,82
W_{50}	0,07	0,07	0,07	0,06	0,07
P_c	40	37	31	38	37
Linearita, výtěžnost, přesnost					
	Floridzin	Floretin	Chlorogenová k.	Rutin	Kvercitrin
Linearita R^2	0,993	0,998	0,997	0,998	0,996
Výtěžnost [%]	88,74	90,44	123,21	97,25	86,54
RSD Přesnost [%]	2,07	4,56	2,40	4,21	3,23
Opakovatelnost (n=6)					
Koncentrační hladiny	RSD [%]				
	Floridzin	Floretin	Chlorogenová k.	Rutin	Kvercitrin
20 mg/l	-	0,47	1,37	0,46	1,16
100 mg/l	-	0,68	0,72	0,91	0,90
250 mg/l	-	1,62	1,59	1,67	1,75
1000 mg/l	0,34	-	-	-	-
4000 mg/l	0,51	-	-	-	-
8000 mg/l	0,76	-	-	-	-

Zkratky: retenční čas (t_R), rozlišení chromatografických píků (R_S), šířka píku v 50% výšky (w_{50}), píková kapacita (P_c) a faktor symetrie (A_S).

3.3.1.1. Příklad chromatogramu - jablůň



Obrázek 1: Chromatogram reálného extraktu z listů odrůdy 'Rubinola' při třech různých vlnových délkách detekce

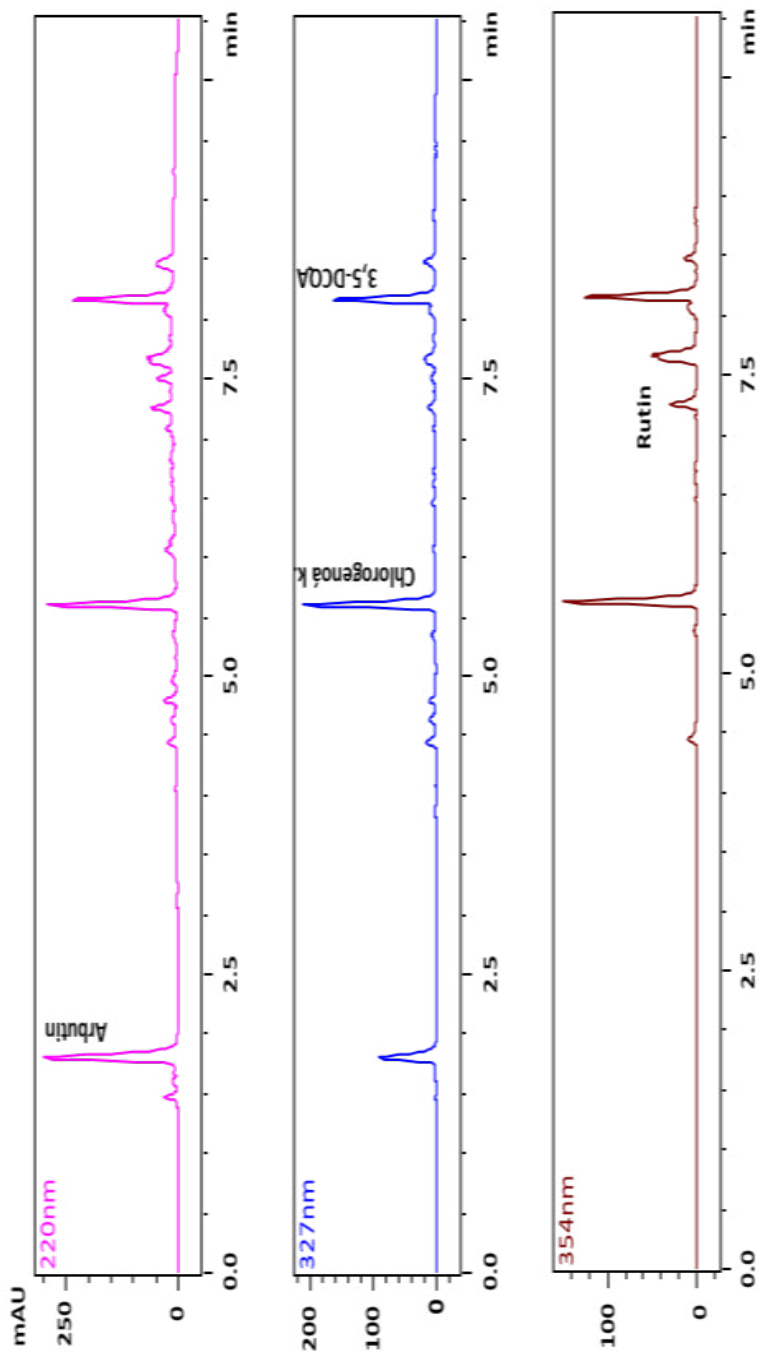
3.3.2. Validační parametry HPLC metody pro separaci fenolických látek v hrušni

Tabulka 3: Validační parametry Hrušeň: test vhodnosti chromatografického systému, linearita, výtěžnost, přesnost, opakovatelnost

Test vhodnosti systému					
	Arbutin	Chlorogenová k.	3,5-DCQA	1,5-DCQA	Rutin
t_R	2,28	5,635	8,171	8,275	7,361
A_S	1,843	1,577			1,64
R_S	7663	27,004	0,937	0,937	16,632
W_{50}	0,071	0,051	0,053	0,057	0,05
P_c	56	59	45	45	56
Linearita, výtěžnost, přesnost					
	Arbutin	Chlorogenová k.	3,5-DCQA	1,5-DCQA	Rutin
Linearita R^2	0,999	0,998	0,999	0,999	0,997
Výtěžnost [%]	102,68	88,67	131,61	96,20	114,26
RSD Přesnost [%]	0,83	2,69	1,42	-	3,10
Opakovatelnost (n=8)					
Koncentrační hladiny	RSD [%]				
	Arbutin	Chlorogenová k.	3,5-DCQA	1,5-DCQA	Rutin
20 mg/l	-	-	2,03	1,46	1,15
100 mg/l	1,22	0,49	2,63	3,09	1,28
250 mg/l	-	-	2,28	2,78	0,81
500 mg/l	0,63	0,56	-	-	-
1000 mg/l	0,81	0,62	-	-	-

Zkratky: retenční čas (t_R), rozlišení chromatografických píků (R_S), šířka píku v 50% výšky (w_{50}), píková kapacita (P_c) a faktor symetrie (A_S).

3.3.2.1. Příklad chromatogramu - hrušeň



Obrázek 2: Chromatogram reálného extraktu z listů odrůdy 'Konference' při třech různých vlnových délkách detekce

3.4. Výsledky

Z každého připraveného extraktu (postup přípravy v kap. 3.1.5.) byly provedeny tři nástřiky na kolonu, ze kterých byla stanovena průměrná hodnota plochy píku. Z průměrných hodnot ploch píků jednotlivých analytů a standardů byla vypočtena koncentrace jednotlivých fenolických látek v mg/l dle následujícího vzorce:

$$C_X = \frac{A_X}{A_{ST}} * C_{ST}$$

A_X průměrná plocha píku analytu

A_{ST} průměrná plocha píku standardu

C_X koncentrace analytu

C_{ST} koncentrace standardu

Koncentrace standardu se vypočítá:

$$C_{ST} = C_{ZAS} * \text{zředění}$$

$$C_{ST} = C_{ZAS} * \frac{V_{\text{zásobních roztoků}}}{V_{\text{celkový}}}$$

C_{ZAS} koncentrace zásobního roztoku

Výsledná koncentrace analytů v následujících tabulkách je uvedena v mg/g sušiny rostlinného materiálu. Nejprve se provedl přepočet obsahu na množství použitého rozpouštědla, tj. na 2 ml (2 ml metanolu s 0,1% kyselinou mravenčí). Výsledkem byla koncentrace v mg/ml. Ta byla dále přepočítána na hodnotu reálné navážky vzorku a dále na mg/g s korekcí na čistotu daného standardu.

Po HPLC analýzách byly extrakty zředěny a změřeny průtokovou metodou pro stanovení celkové antioxidační aktivity.

3.4.1. Jablň

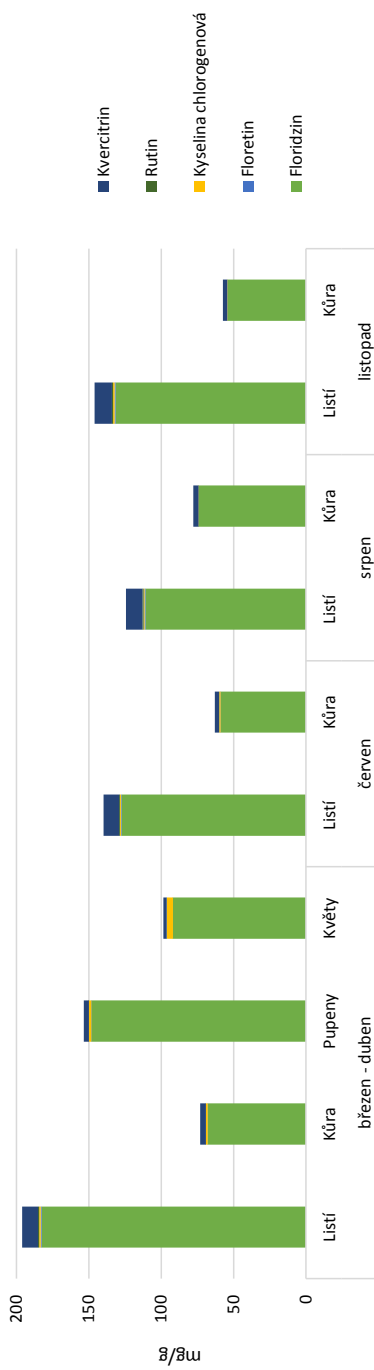
3.4.1.1. Sledování fenolického profilu v jednotlivých odrůdách jabloní

3.4.1.1.1. 'Topaz'

Tabulka 4: Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Topaz' v mg/g

'Topaz'	Březen-duben 2020					Červen 2020		Srpen 2020		Listopad 2020	
	Listí	Kůra	Pupeny	Květy		Listí	Kůra	Listí	Kůra	Listí	Kůra
Floridzin	182,69	67,92	148,25	91,78		127,52	58,98	110,98	74,09	131,67	54,08
Floretin	0,56	0,01	0,14	0,04	0,31	0,02	0,02	0,54	0,03	0,52	0,01
Kyselina chlorogenová	1,01	1,19	1,54	4,13	0,61	0,86	0,7	0,09	0,16	1,08	0,23
Rutin	0,87	0,12	0,14	0,31	0,72	0,1	0,7	0,09	0,09	0,75	0,1
Kvercitrin	10,98	3,77	3,34	2,32	10,71	2,94	11,43	3,48	3,48	11,93	2,92
Celkem	196,11	73,01	153,41	98,58	139,87	62,9	124,35	77,85	77,85	145,95	57,34

Graf 1: 'Topaz' - obsah fenolických látek v mg/g

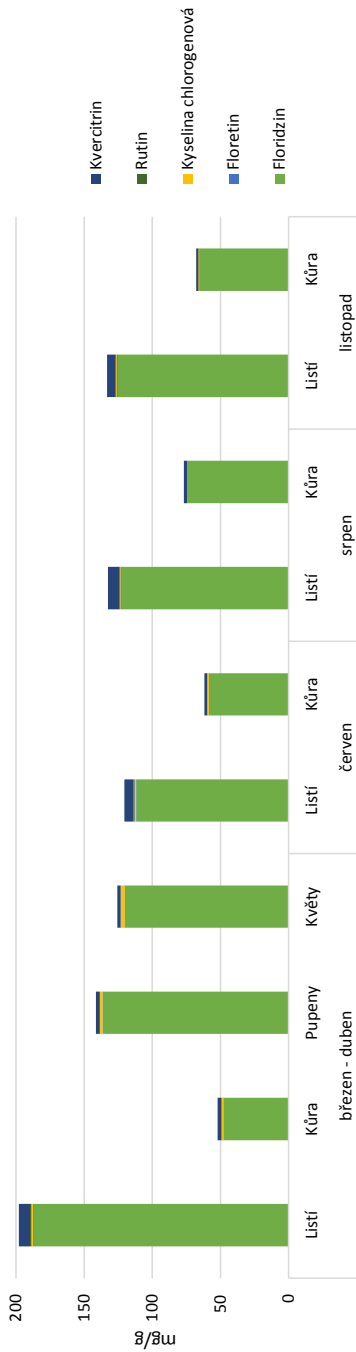


3.4.1.1.2. 'Golden Delicious'

Tabulka 5: Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Golden Delicious' v mg/g

'Golden Delicious'	Březen-duben 2020			Červen 2020		Srpen 2020		Listopad 2020		
	Listí	Kůra	Pupeny	Květy	Listí	Kůra	Listí	Kůra	Listí	Kůra
Floridzin	186,9	47,72	136,32	120,19	111,61	58,58	122,41	73,91	125,29	65,66
Floretin	0,72	0,01	0,2	0,11	0,56	0,01	0,53	0,03	0,48	0,01
Kyselina chlorogenová	0,95	1,3	1,96	2,66	0,67	1,08	0,43	0,32	0,61	0,52
Rutin	1,06	0,25	0,14	0,32	0,86	0,12	0,85	0,21	0,48	0,08
Kvercitrin	8,26	2,76	2,71	2,4	6,71	1,87	8,2	2,41	6,26	1,57
Celkem	197,89	52,04	141,33	125,68	120,41	61,66	132,42	76,88	133,12	67,84

Graf 2: 'Golden Delicious' - obsah fenolických látek v mg/g

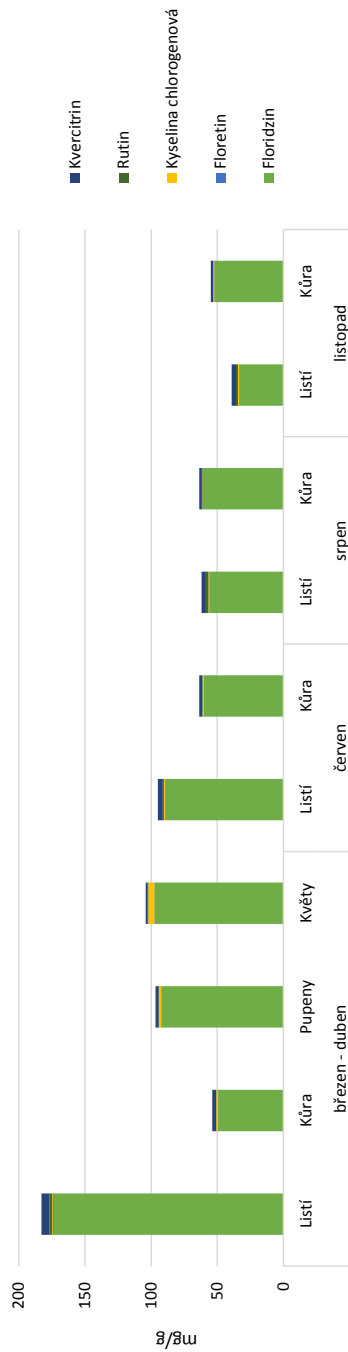


3.4.1.1.3. 'Angold'

Tabulka 6: Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Angold' v mg/g

'Angold'	Březen-duben 2020					Červen 2020		Srpen 2020		Listopad 2020	
	Listí	Kůra	Pupeny	Květy	Kůra	Listí	Kůra	Listí	Kůra	Listí	Kůra
Floridzin	173,44	49,32	92,34	97,45	88,94	60,13	55,89	60,9	33,4	52,29	
Floretin	0,58	0,01	0,13	0,06	0,72	0,02	0,37	0,02	0,3	0,01	
Kyselina chlorogenová	0,77	1,39	1,73	4,7	0,61	0,8	0,26	0,38	0,54	0,55	
Rutin	1,88	0,26	0,12	0,43	0,95	0,43	2,05	0,28	1,54	0,2	
Kvercitrin	6,07	2,79	2,25	1,5	3,7	2,15	3,32	2,02	3,39	1,87	

Graf 3: 'Angold' - obsah fenolických látek v mg/g

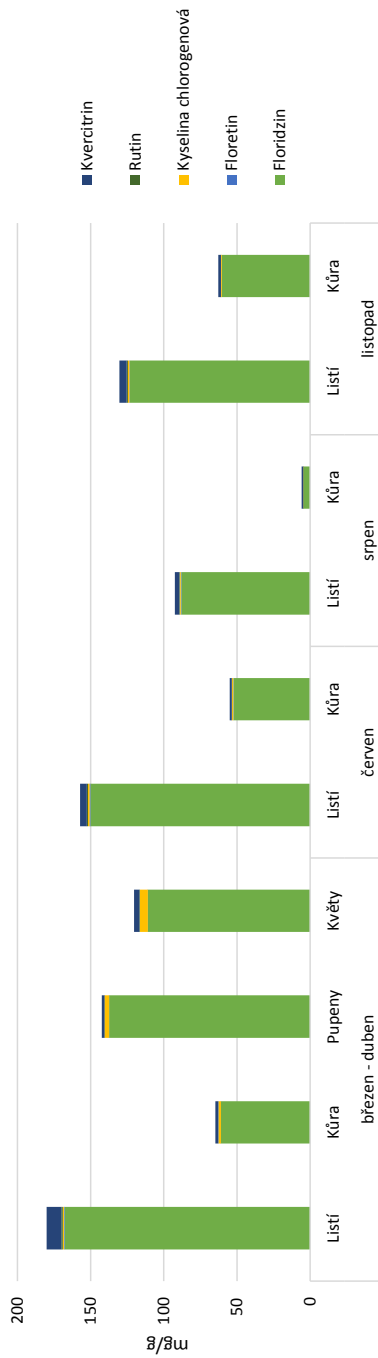


3.4.1.1.4. 'Meteor'

Tabulka 7: Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Meteor' v mg/g

'Meteor'	Březen-duben 2020			Červen 2020		Srpen 2020		Listopad 2020		
	Listí	Kůra	Pupeny	Květy	Listí	Kůra	Listí	Kůra	Listí	Kůra
Floridzin	167,83	60,92	137,33	110,88	150,1	52,44	88,12	4,56	123,12	60,35
Floretin	0,34	0,01	0,03	0,06	0,72	0,02	0,4	0,01	0,45	0,02
Kyselina chlorogenová	0,79	1,66	3,21	5,27	1,03	0,91	0,48	0,04	1,02	0,51
Rutin	1,11	0,21	0,08	0,4	0,77	0,14	0,52	0,23	0,72	0,16
Kvercitrin	9,9	1,96	1,65	3,63	4,6	1,39	2,95	0,91	5,12	1,75
Celkem	179,97	64,76	142,3	120,24	157,22	54,9	92,47	5,75	130,43	62,79

Graf 4: 'Meteor' - obsah fenolických látek v mg/g

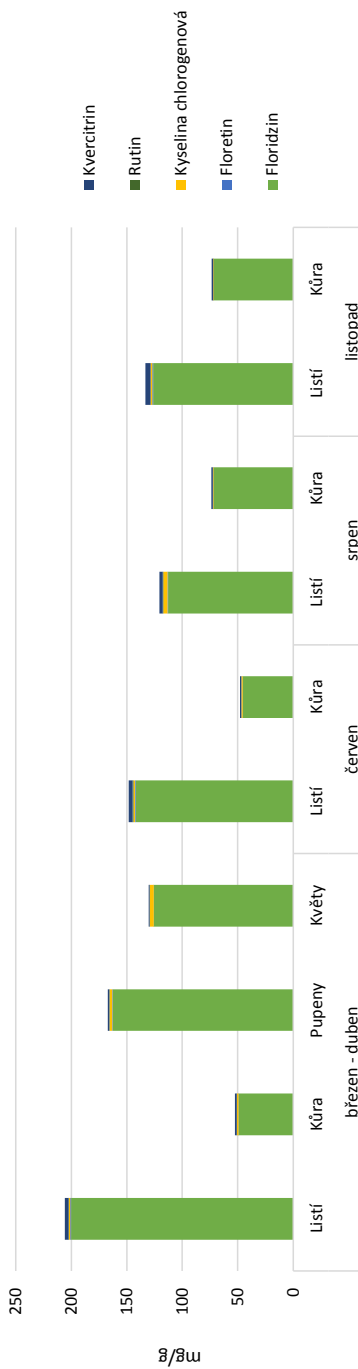


3.4.1.1.5. 'Melrose'

Tabulka 8: Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Melrose' v mg/g

'Melrose'	Březen-duben 2020				Červen 2020		Srpen 2020		Listopad 2020	
	Listí	Kůra	Pupeny	Květy	Listí	Kůra	Listí	Kůra	Listí	Kůra
Floridzin	200,17	49,44	162,63	125,58	142,18	45,57	112,87	71,64	126,22	71,54
Floretin	0,7	0,01	0,54	0,07	0,51	0,03	0,42	0,02	0,87	0,01
Kyselina chlorogenová	1,08	1,33	2,42	3,48	1,36	1,12	3,87	0,6	1,33	0,65
Rutin	0,6	0,14	0,11	0,28	0,64	0,12	0,43	0,09	0,29	0,05
Kvercitrin	3,34	1,67	1,5	0,89	3,56	1,25	2,95	1,48	4,36	1,34

Graf 5: 'Melrose' - obsah fenolických látek v mg/g

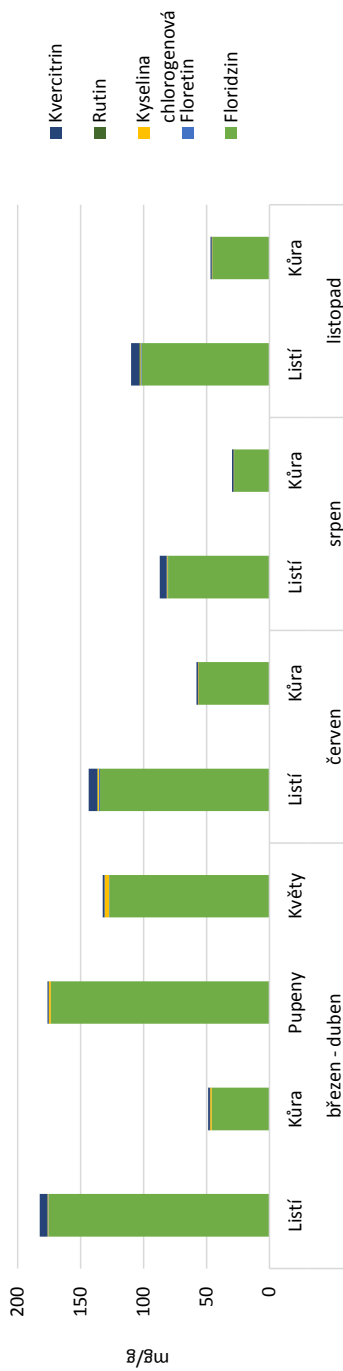


3.4.1.1.6. 'Fuji'

Tabulka 9: Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Fuji' v mg/g

'Fuji'	Březen-duben 2020				Červen 2020		Srpen 2020		Listopad 2020	
	Listí	Kůra	Pupeny	Květy	Listí	Kůra	Listí	Kůra	Listí	Kůra
Floridzin	175,13	45,96	173,63	127,36	134,57	56,06	80,49	28,09	101,65	45,45
Floretin	0,46	0,01	0,08	0,06	0,94	0,01	0,33	0,01	0,43	0,01
Kyselina chlorogenová	0,57	1,09	1,52	3,36	0,92	0,53	0,34	0,35	0,61	0,3
Rutin	0,53	0,19	0,13	0,26	0,42	0,15	0,57	0,07	0,76	0,1
Kvercitrin	5,88	1,51	1,09	1,39	6,71	1,15	5,53	1,24	6,56	0,94
Celkem	182,57	48,76	176,45	132,43	143,56	57,9	87,26	29,76	110,01	46,8

Graf 6: 'Fuji' - obsah fenolických látek v mg/g

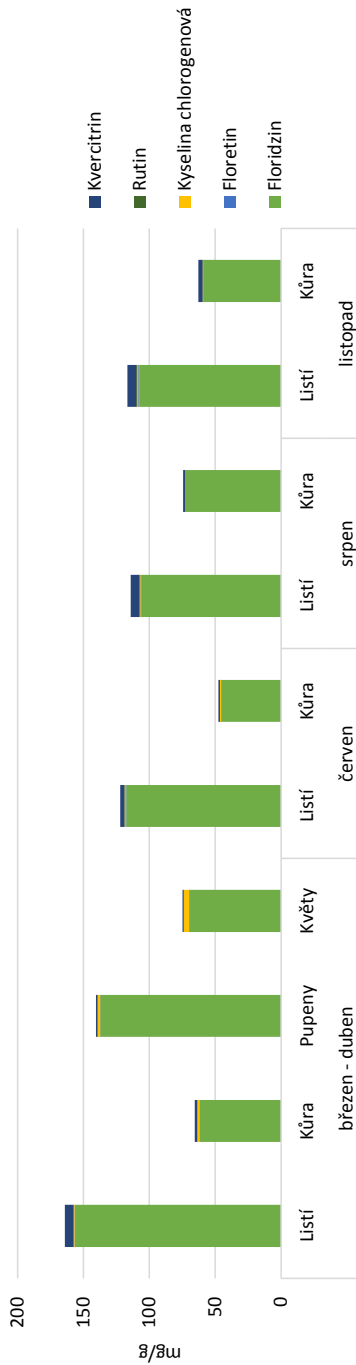


3.4.1.1.7. 'Braeburn'

Tabulka 10: Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Braeburn' v mg/g

'Braeburn'	Březen-duben 2020			Červen 2020		Srpen 2020		Listopad 2020		
	Listí	Kůra	Pupeny	Květy	Listí	Kůra	Listí	Kůra	Listí	Kůra
Floridzin	156,33	61,96	137,23	69,83	117,61	45,52	106,09	72,4	107,55	59,22
Floretin	0,37	0,07	0,07	0,06	0,72	0,02	0,37	0,02	0,88	0,01
Kyselina chlorogenová	0,47	1,41	2,05	3,72	0,51	0,9	0,41	0,38	0,75	0,42
Rutin	0,5	0,16	0,11	0,26	0,18	0,1	0,77	0,08	0,85	0,07
Kvercitrin	6,58	2,01	1,09	1,04	3,19	1,08	6,42	1,48	6,68	3,17
Celkem	164,25	65,61	140,55	74,91	122,21	47,62	114,06	74,36	116,71	62,89

Graf 7: 'Braeburn' - obsah fenolických látek v mg/g

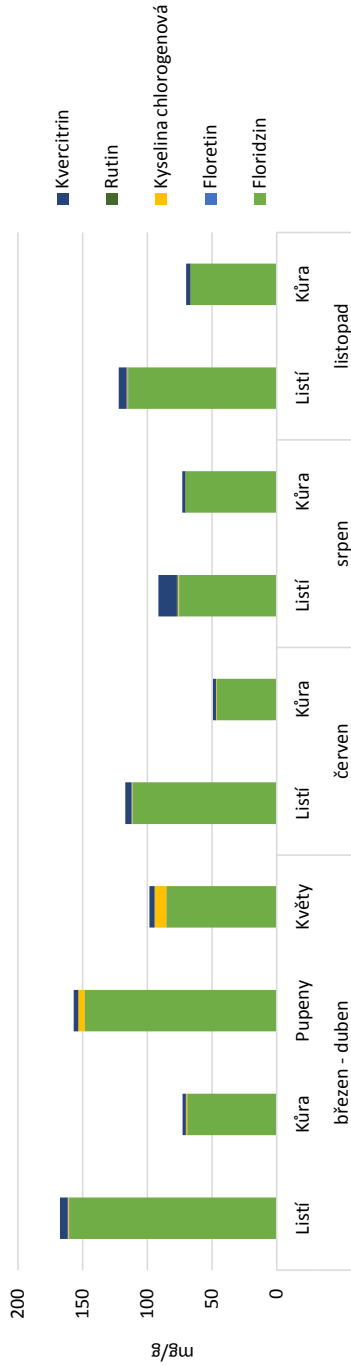


3.4.1.1.8. 'Lady Silvia'

Tabulka 11: Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Lady Silvia' v mg/g

'Lady Silvia'	Březen-duben 2020			Červen 2020		Srpen 2020		Listopad 2020		
	Listí	Kůra	Pupeny	Květy	Listí	Kůra	Listí	Kůra	Listí	Kůra
Floridzin	160,29	69,19	148,36	85,16	110,96	46,48	75,24	70,41	114,72	66,59
Floretin	0,34	0,01	0,06	0,03	0,62	0,01	0,61	0,02	0,82	0,01
Kyselina chlorogenová	0,73	0,74	4,97	9,08	0,36	0,42	0,53	0,23	0,6	0,04
Rutin	0,13	0,2	0,17	0,14	0,37	0,16	0,77	0,04	0,05	0,16
Kvercitrin	6,08	2,58	3,44	3,95	4,81	2,16	14,3	2,39	5,9	3,33
Celkem	167,57	72,72	157	98,36	117,12	49,23	91,45	73,09	122,09	70,13

Graf 8: 'Lady Silvia' - obsah fenolických látek v mg/g

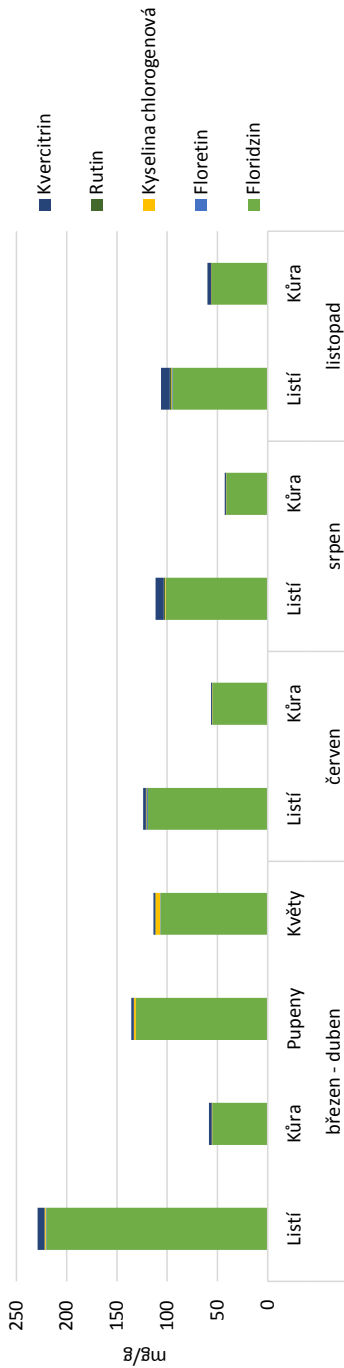


3.4.1.1.9. 'Rubinstep'

Tabulka 12: Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Rubinstep' v mg/g

'Rubinstep'	Březen-duben 2020			Červen 2020		Srpen 2020		Listopad 2020		
	Listí	Kůra	Pupeny	Květy	Listí	Kůra	Listí	Kůra	Listí	Kůra
Floridzin	220,3	55,07	131,15	106,88	119,09	55,07	101,28	41,25	94,67	56,12
Floretin	0,64	0,01	0,03	0,03	0,8	0,02	0,47	0,01	0,46	0
Kyselina chlorogenová	0,69	0,66	1,91	4,72	0,61	0,25	0,44	0,21	0,64	0,05
Rutin	0,82	0,14	0,09	0,45	0,7	0,09	1,1	0,07	1,57	0,32
Kvercitrin	6,4	2,48	2,67	1,6	2,71	0,94	8,33	1,17	8,8	3,33
Celkem	228,85	58,36	135,85	113,68	123,91	56,37	111,62	42,71	106,14	59,82

Graf 9: 'Rubinstep' - obsah fenolických látek v mg/g

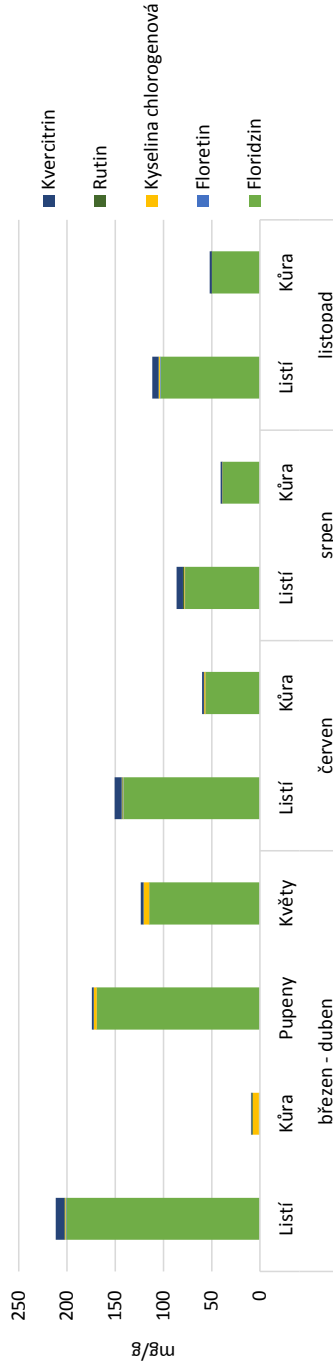


3.4.1.1.10. 'Rubin'

Tabulka 13: Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Rubin' v mg/g

'Rubin'	Březen-duben 2020			Červen 2020		Srpen 2020		Listopad 2020		
	Listí	Kůra	Pupeny	Květy	Listí	Kůra	Listí	Kůra	Listí	Kůra
Floridzin	200,74	0,94	169,03	114,64	141,31	56,5	77,64	38,95	103,07	49,73
Floretin	0,46	0	0,11	0,04	0,43	0,01	0,27	0,01	0,5	0
Kyselina chlorogenová	0,7	6,3	2,89	5,61	0,7	1,19	0,61	0,06	0,97	0,04
Rutin	1,08	1,34	0,17	0,35	0,81	0,2	1,28	0,08	0,78	0,21
Kvercitrin	8,71	0,8	2,03	3,01	7,47	2,08	6,52	1,51	6,15	2,21
Celkem	211,69	9,38	174,23	123,65	150,72	59,98	86,32	40,61	111,47	52,19

Graf 10: 'Rubin' - obsah fenolických látek v mg/g



Kůra v období březen-duben 2020 vykazovala i po opakovaném změření neobvykle nízké koncentrace floridzinu. Důvodem je chybné zpracování kůry (po odběru se z větviček namísto vrchní části odebralo víc dužnaté části). Experiment bude v březnu 2021 zopakován.

3.4.1.1.11. Štěpka jabloní

Tabulka 14: Koncentrace fenolických látek ve vzorku štěpky v mg/g

Štěpka	mg/g
Floridzin	48,42
Floretin	0,03
Kyselina chlorogenová	0,63
Rutin	0,07
Kvercitrin	1,58
Celkem	50,73

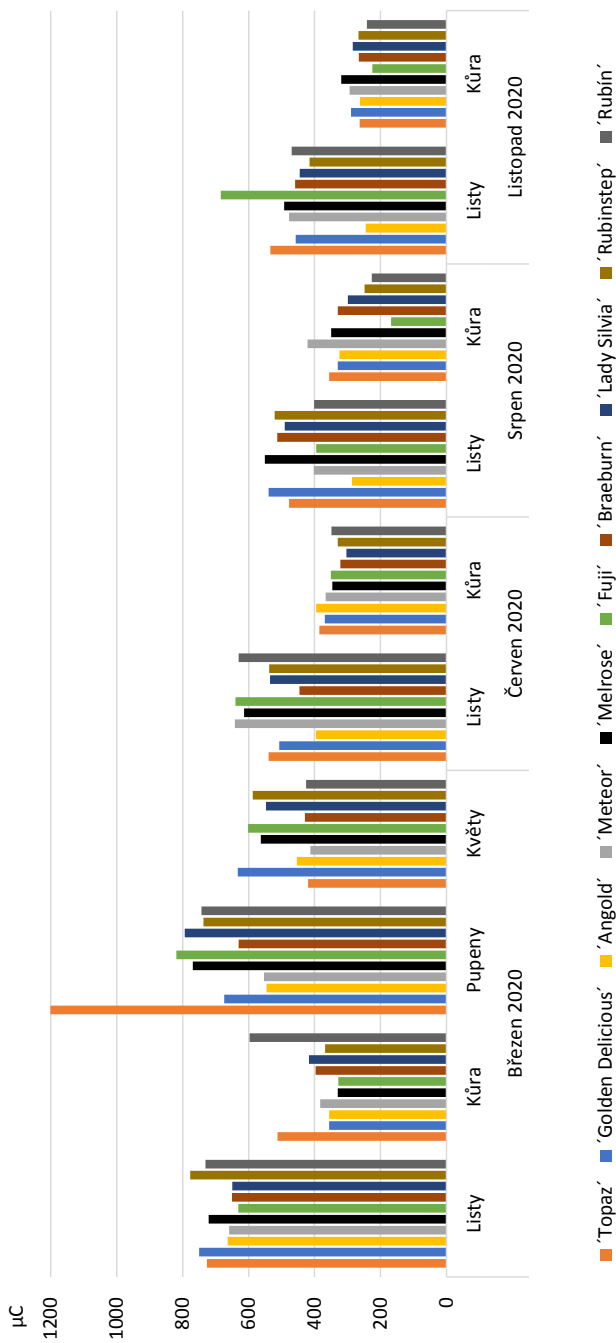
3.4.1.1.12. Sledování změn v celkové antioxidační aktivitě v jednotlivých materiálech jabloně

Podmínky měření uvedeny v kapitole 3.2.2.

Tabulka 15: Celková antioxidační aktivita biomasy jabloní v µC

Odrůda	Březen 2020				Červen 2020		Srpen 2020		Listopad 2020	
	Listy	Kůra	Pupeny	Květy	Listí	Kůra	Listí	Kůra	Listí	Kůra
'Topaz'	725,93	511,77	1232,30	419,47	539,30	385,53	476,90	355,83	533,68	263,48
'Golden Delicious'	750,10	355,80	674,27	632,50	507,20	369,10	539,45	329,37	457,17	289,17
'Angold'	663,50	355,87	545,00	453,53	396,17	394,83	286,58	324,07	244,95	262,58
'Meteor'	658,67	382,90	552,90	412,70	641,40	366,47	402,47	421,22	477,08	293,60
'Melrose'	720,93	329,83	768,80	562,47	613,20	346,53	550,52	349,77	492,23	319,50
'Fuji'	630,70	327,63	818,90	601,43	640,20	350,10	395,35	167,52	683,93	224,85
'Braeburn'	650,20	397,23	630,33	429,57	445,83	321,57	513,05	329,15	458,85	266,05
'Lady Silvia'	649,10	416,70	793,63	546,90	535,10	303,27	490,07	299,07	444,48	284,05
'Rubinstep'	777,10	368,27	736,73	587,50	537,27	329,17	520,55	248,67	415,22	266,28
'Rubin'	730,27	596,87	742,83	425,93	630,57	348,57	401,23	226,47	469,58	241,63
štěpka	339,33									

Grafické znázornění:



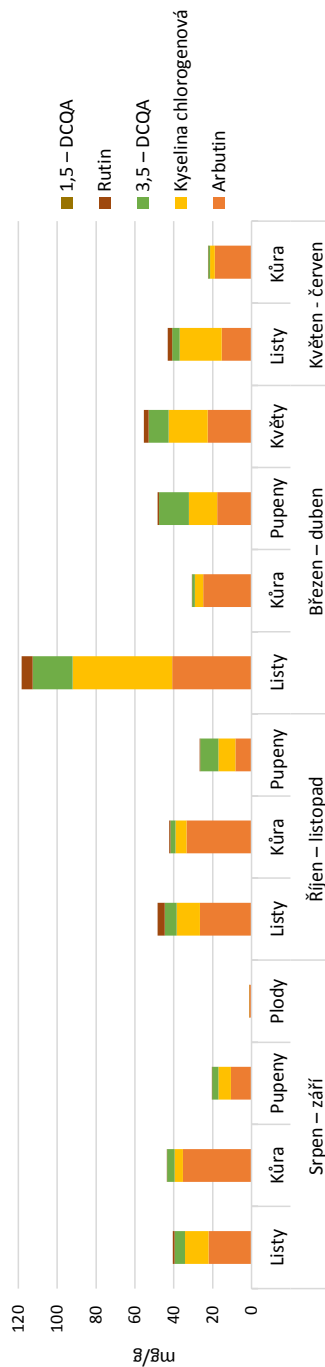
3.4.2.1.1. Sledování fenolického profilu v jednotlivých odrůdách hrušní

3.4.2.1.1.1. 'Clapova'

Tabulka 16: Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Clapova' v mg/g

'Clapova'	Srpen – září 2019			Říjen – listopad 2019			Březen – duben 2020			Červen 2020	
	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra	Pupeny	Květy	Kůra
Arbutin	22,13	35,31	10,54	26,48	33,41	8,33	40,86	24,86	17,69	22,59	18,84
Kys. chlorogenová	12,14	4,22	6,52	12,07	5,76	8,70	51,28	4,32	14,59	20,10	2,53
3,5 – DCQA	5,25	3,83	3,23	6,18	2,57	9,39	20,45	1,31	15,31	10,30	0,95
Rutin	0,94	0,23	0,06	3,56	0,56	0,33	5,74	0,17	0,69	2,46	0,16
1,5 – DCQA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celkem	40,46	43,59	20,35	48,29	42,3	26,75	118,33	30,66	48,28	55,45	22,48

Graf 11: 'Clapova' - obsah fenolických látek v mg/g

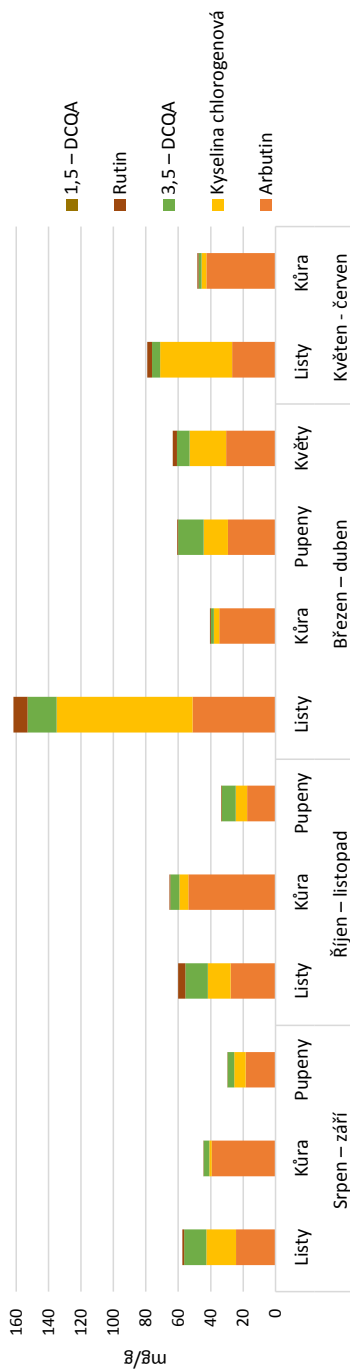


3.4.2.1.2. 'Konference'

Tabulka 17: Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Konference' v mg/g

'Konference'	Srpen – září 2019			Říjen – listopad 2019			Březen – duben 2020			Červen 2020			
	Listy	Kůra	Pupeny	Plody	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra	Pupeny	Květy	Listy	Kůra
Arbutin	24,37	39,37	18,40	1,085	27,70	53,88	17,49	51,24	34,69	29,39	30,44	26,77	42,61
Kys. chlorogenová	18,35	1,42	7,00	0,04	14,04	5,44	7,10	83,87	3,31	14,91	22,67	44,49	3,02
3,5 – DCQA	13,63	3,59	4,07	-	13,91	5,55	8,57	17,96	2,00	15,88	7,79	4,90	1,88
Rutin	1,19	0,09	0,07	0,00	4,51	0,52	0,42	8,62	0,49	0,49	2,53	2,96	0,69
1,5 – DCQA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celkem	57,54	44,47	29,54	1,13	60,16	65,39	33,58	161,69	40,49	60,67	63,43	79,12	48,20

Graf 12: 'Konference' - obsah fenolických látek v mg/g

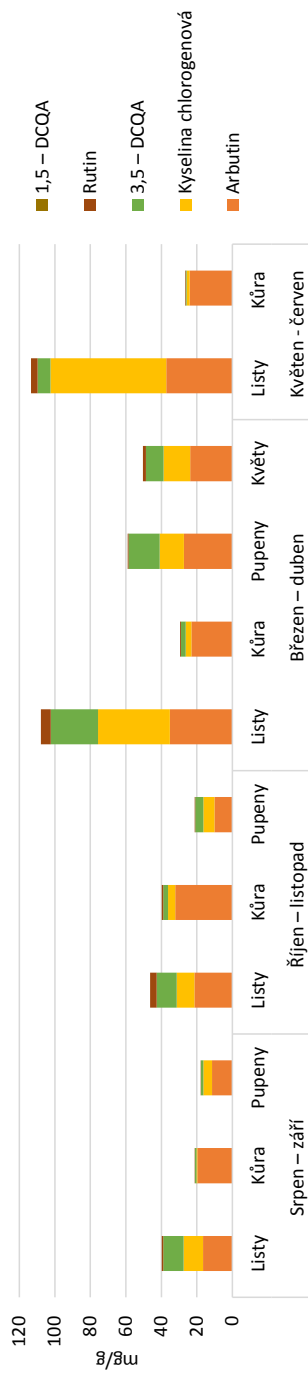


3.4.2.1.3. 'Williamsova červená'

Tabulka 18: Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Williamsova červená' v mg/g

'Williamsova červená'	Srpen – září 2019			Říjen – listopad 2019			Březen – duben 2020			Červen 2020	
	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra	Pupeny	Květy	Kůra
Arbutin	16,48	19,64	11,48	21,46	32,23	10,11	35,21	23,15	27,23	23,79	37,24
Kyselina chlorogenová	10,95	0,53	4,84	9,93	4,03	6,23	40,46	3,11	13,76	14,90	65,26
3,5 – DCQA	11,45	0,96	1,39	11,20	2,66	4,50	26,64	2,80	17,49	10,03	7,14
Rutin	0,88	0,08	0,03	3,73	0,92	0,39	5,54	0,45	0,51	1,61	3,80
1,5 – DCQA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celkem	39,76	21,21	17,74	46,32	39,84	21,23	107,85	29,51	58,99	50,33	113,45

Graf 13: 'Williamsova červená' – obsah fenolických látek v mg/g

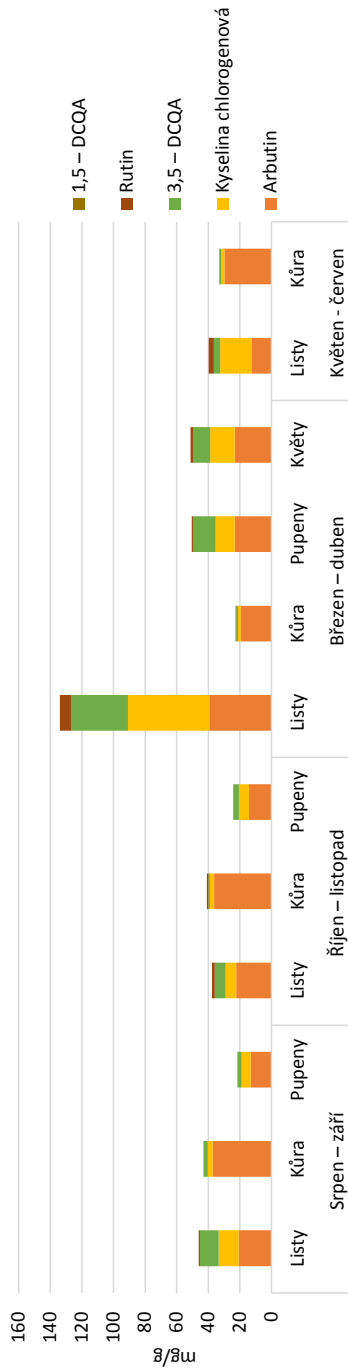


3.4.2.1.4. 'Williamsova'

Tabulka 19: Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Williamsova' v mg/g

'Williamsova'	Srpen – září 2019		Říjen – listopad 2019		Březen – duben 2020			Červen 2020		
	Listy	Kůra	Listy	Kůra	Listy	Kůra	Pupeny	Květy	Listy	Kůra
Arbutin	20,71	37,28	22,41	36,30	39,30	19,48	23,24	23,25	12,41	29,85
Kys. chlorogenová	12,65	3,02	6,63	2,67	51,57	1,68	12,01	15,58	19,97	1,93
3,5 – DCQA	11,90	2,50	6,84	0,99	35,94	1,08	14,44	10,85	4,13	0,97
Rutin	0,74	0,12	1,79	0,98	6,97	0,43	0,73	1,53	3,21	0,21
1,5 – DCQA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celkem	46	42,93	37,67	40,94	133,78	22,67	50,42	51,21	39,72	32,96

Graf 14: 'Williamsova' - obsah fenolických látek v mg/g

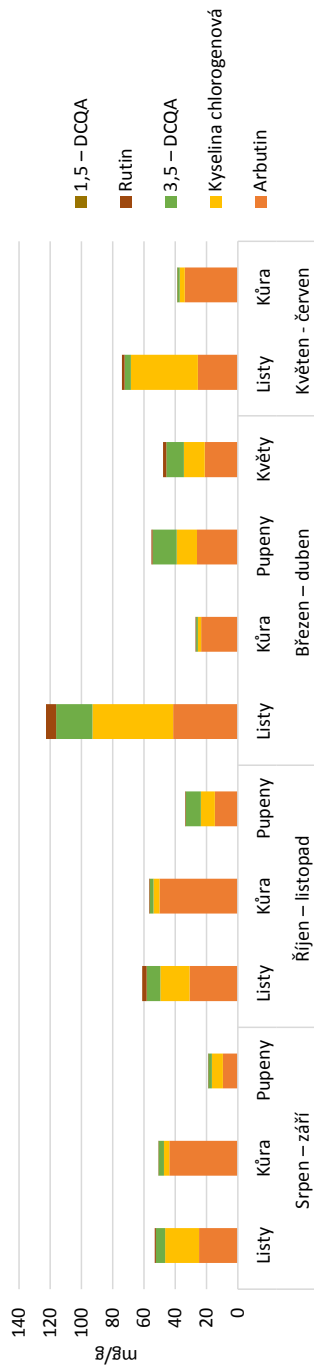


3.4.2.1.5. 'Charneuská'

Tabulka 20: Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Charneuská' v mg/g

'Charneuská'	Srpen – září 2019			Říjen – listopad 2019			Březen – duben 2020			Červen 2020	
	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra
Arbutin	24,75	43,96	9,66	30,89	50,08	14,65	41,31	23,41	26,21	21,16	34,03
Kys. chlorogenová	21,87	3,28	6,90	18,72	3,80	9,07	51,73	2,08	12,87	13,32	3,09
3,5 – DCQA	5,79	3,53	2,38	8,78	2,59	9,57	23,16	1,30	15,47	11,24	1,52
Rutin	0,78	0,17	0,04	2,77	0,40	0,53	6,61	0,24	0,68	2,23	0,14
1,5 – DCQA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celkem	53,19	50,94	18,98	61,16	56,87	33,82	122,81	27,03	55,23	47,95	38,78

Graf 15: 'Charneuská' - obsah fenolických látek v mg/g

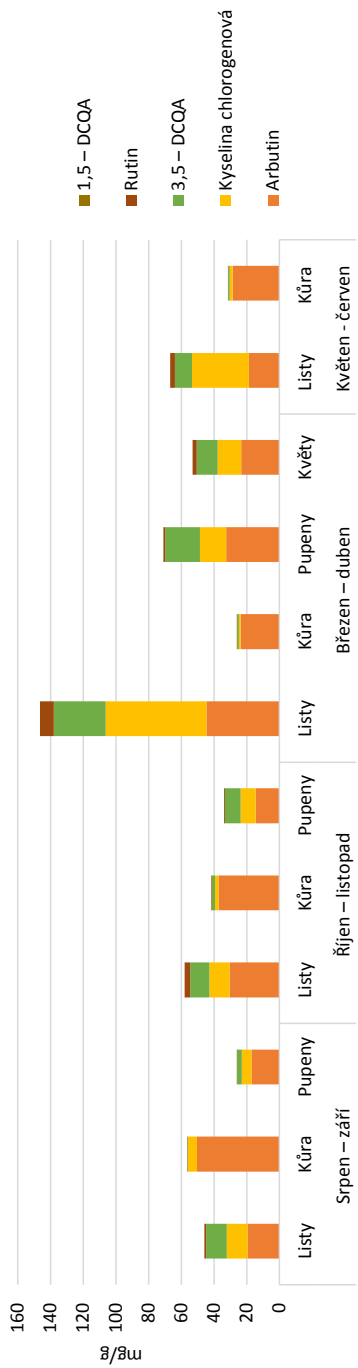


3.4.2.1.6. 'Lucasova'

Tabulka 21: Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Lucasova' v mg/g

'Lucasova'	Srpen – září 2019		Říjen – listopad 2019		Březen – duben 2020			Červen 2020		
	Listy	Kůra	Listy	Kůra	Listy	Kůra	Pupeny	Květy	Listy	Kůra
Arbutin	19,47	50,44	30,37	37,15	44,58	23,64	32,56	23,33	18,66	28,66
Kys. chlorogenová	12,74	5,57	6,02	2,26	61,73	1,24	16,07	14,37	34,83	1,79
3,5 – DCQA	12,56	0,34	2,86	1,94	31,57	0,98	21,25	12,89	10,35	0,80
Rutin	1,09	0,19	0,02	3,35	8,48	0,19	1,13	2,52	2,97	0,15
1,5 – DCQA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celkem	45,86	56,55	25,92	41,76	146,36	26,05	71,01	53,11	66,82	31,41

Graf 16: 'Lucasova' - obsah fenolických látek v mg/g

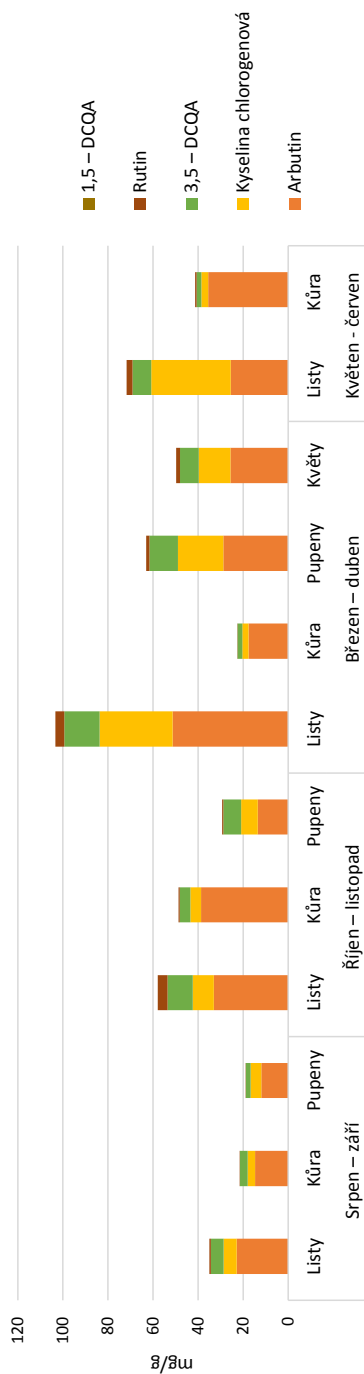


3.4.2.1.7. 'Highland'

Tabulka 22: Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Highland' v mg/g

'Highland'	Srpen – září 2019			Říjen – listopad 2019			Březen – duben 2020			Červen 2020	
	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra	Pupeny	Květy	Kůra
Arbutin	22,89	14,75	11,89	33,07	38,62	13,56	51,27	17,64	28,79	25,65	35,47
Kys. chlorogenová	5,75	3,24	4,78	9,35	4,85	7,36	32,47	2,77	20,19	14,09	3,12
3,5 – DCQA	5,68	3,37	2,07	11,18	4,70	7,92	15,66	2,10	12,64	8,31	2,06
Rutin	0,64	0,06	0,04	4,32	0,45	0,53	4,01	0,08	1,39	1,70	0,63
1,5 – DCQA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celkem	34,96	21,42	18,78	57,92	48,62	29,37	103,41	22,59	63,01	49,75	41,28

Graf 17: 'Highland' - obsah fenolických látek v mg/g

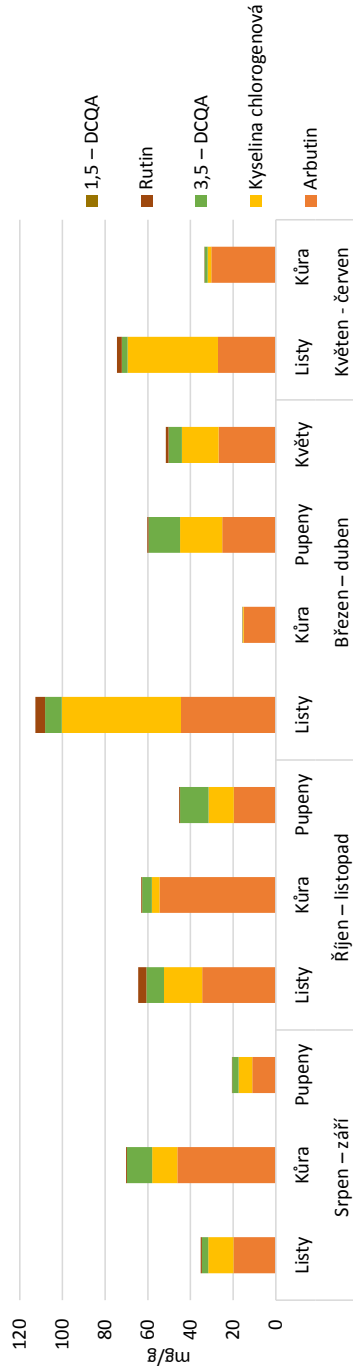


3.4.2.1.8. 'Grosdemange'

Tabulka 23: Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Grosdemange' v mg/g

'Grosdemange'	Srpen – září 2019			Říjen – listopad 2019			Březen – duben 2020			Červen 2020		
	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra	Pupeny	Květy	Kůra	
Arbutin	19,87	46,21	11,08	34,45	54,61	19,67	44,40	15,06	25,19	26,81	27,07	30,24
Kys.a chlorogenová	11,86	11,76	6,37	17,93	3,56	11,81	55,99	0,39	19,74	17,24	42,47	1,76
3,5 – DCQA	2,90	11,87	2,95	8,34	4,45	13,48	7,73	0,23	14,75	6,22	2,58	1,32
Rutin	0,56	0,38	0,02	3,79	0,51	0,34	4,54	0,06	0,54	1,26	2,29	0,09
1,5 – DCQA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celkem	35,19	70,22	20,42	64,51	63,13	45,3	112,66	15,74	60,22	51,53	74,41	33,42

Graf 18: 'Grosdemange' - obsah fenolických látek v mg/g

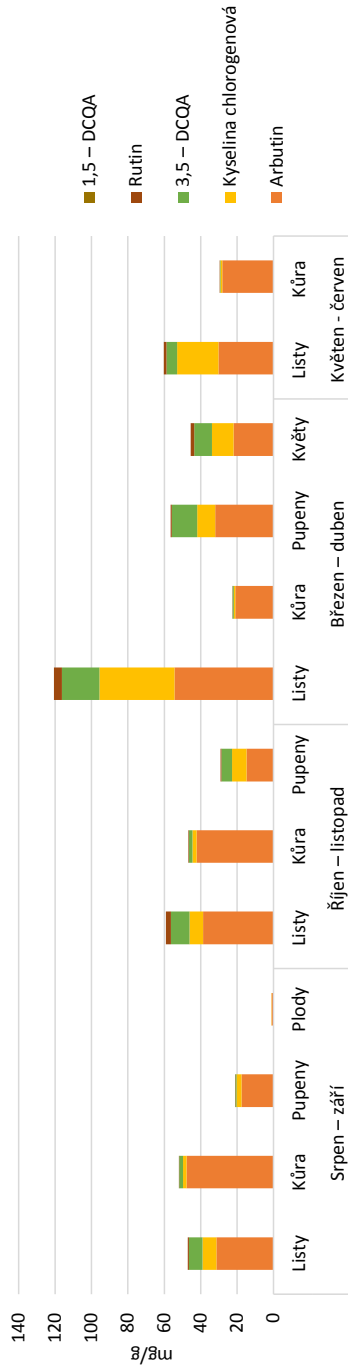


3.4.2.1.9. 'Thirriotova'

Tabulka 24: Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Thirriotova' v mg/g

'Thirriotova'	Srpen – září 2019			Říjen – listopad 2019			Březen – duben 2020			Červen 2020		
	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra	Pupeny	Květy	Kůra	
Arbutin	31,45	47,73	17,52	38,73	42,32	14,79	54,42	20,98	32,07	22,00	30,28	28,16
Kys. chlorogenová	7,51	2,03	2,86	7,41	2,23	7,98	41,25	0,84	9,86	11,82	22,63	0,94
3,5 – DCQA	7,51	2,02	0,59	10,19	1,94	5,86	20,49	0,64	13,96	9,70	5,81	0,40
Rutin	0,68	0,11	0,01	2,78	0,23	0,45	4,45	0,20	0,63	1,92	1,51	0,07
1,5 – DCQA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celkem	47,15	51,89	20,98	59,11	46,72	29,08	120,61	22,66	56,52	45,44	60,23	29,57

Graf 19: 'Thirriotova' - obsah fenolických látek v mg/g

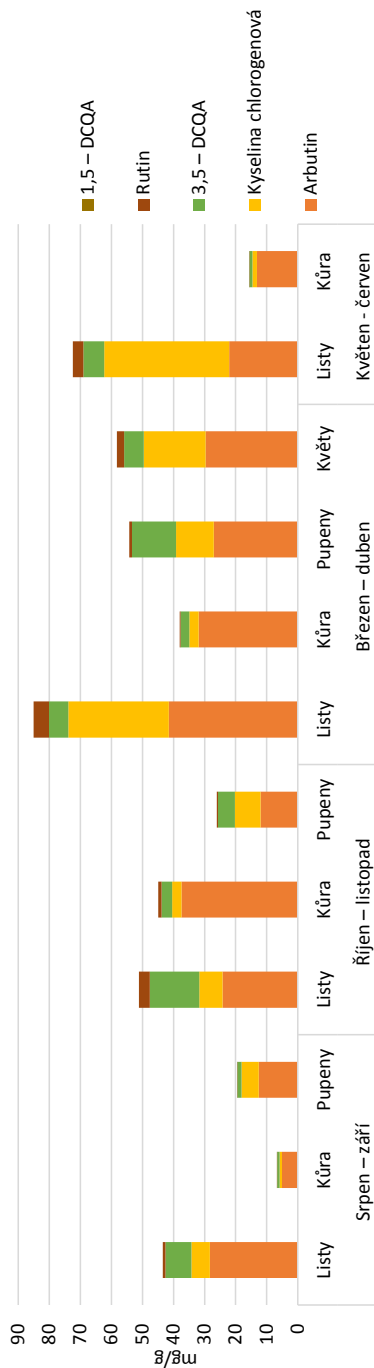


3.4.2.1.10. 'General Leclerc'

Tabulka 25: Koncentrace fenolických látek ve vzorcích odrůdy 'General Leclerc' v mg/g

'General Leclerc'	Srpen – září 2019			Říjen – listopad 2019			Březen – duben 2020			Červen 2020		
	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra	Pupeny	Květy	Listy	Kůra
Arbutin	28,29	5,12	12,56	24,23	37,49	12,03	41,57	31,90	27,06	29,68	22,12	13,16
Kys. chlorogenová	5,90	0,75	5,54	7,45	2,98	8,18	32,29	2,97	12,11	19,90	40,21	1,43
3,5 – DCQA	8,44	0,74	1,39	15,94	3,40	5,47	6,26	2,91	14,24	6,36	6,66	1,01
Rutin	0,88	0,04	0,02	3,56	1,03	0,39	4,92	0,21	0,82	2,27	3,44	0,10
1,5 – DCQA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celkem	43,51	6,65	19,51	51,18	44,9	26,07	85,04	37,99	54,23	58,21	72,43	15,76

Graf 20: 'General Leclerc' - obsah fenolických látek v mg/g



3.4.2.1.11. Štěpka hrušní

Tabulka 26: Koncentrace fenolických látek ve vzorku štěpky v mg/g

Štěpka	mg/g
Arbutin	19,51
Kyselina chlorogenová	2,24
3,5 - DCQA	1,24
Rutin	0,09
Celkem	23,08

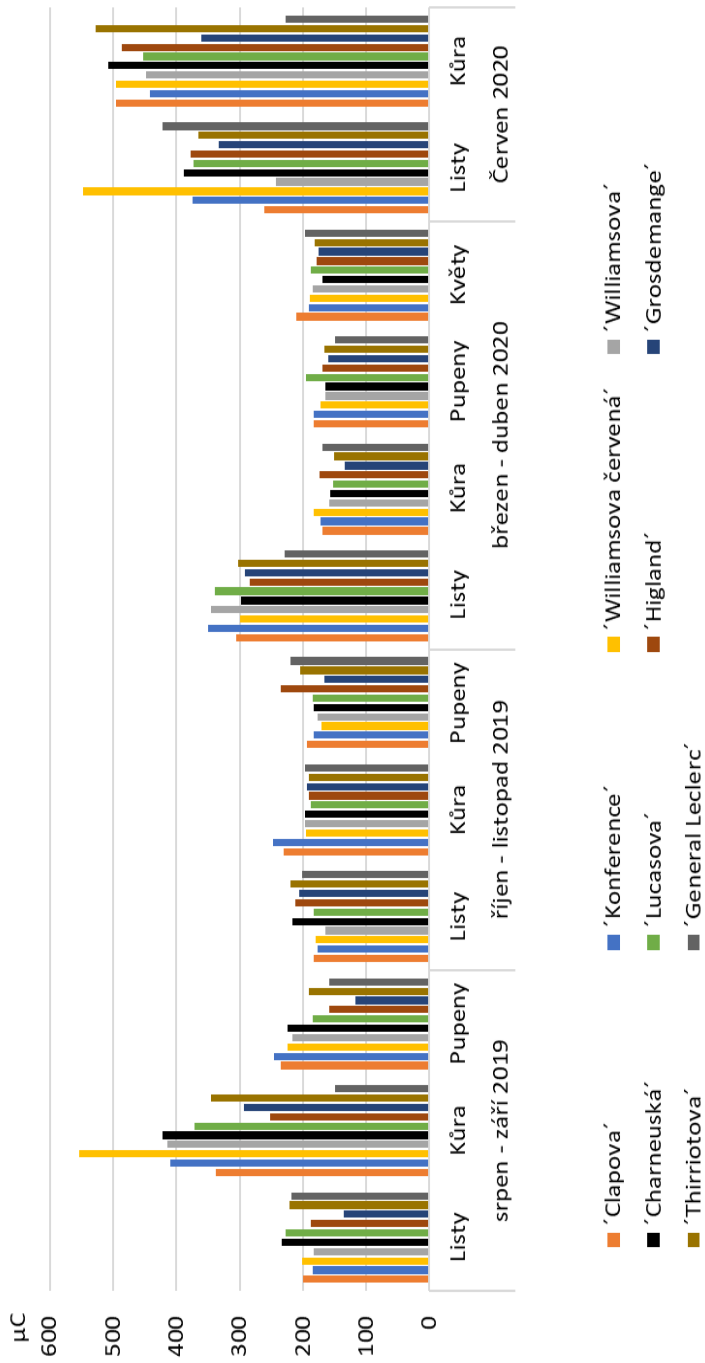
3.4.2.1.12. Sledování změn v celkové antioxidační aktivitě v jednotlivých materiálech hrušní

Podmínky měření uvedeny v kapitole 3.2.2

Tabulka 27: Celková antioxidační aktivita v biomase hrušní v μC

Odrůda	Srpen – září 2019			Říjen – listopad 2019			Březen – duben 2020			Červen 2020		
	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra	Pupeny	Listy	Kůra	Pupeny	Květy	Listy	Kůra
'Clapova'	199,39	338,20	235,00	182,94	230,30	193,80	305,06	168,67	183,59	210,06	260,37	495,53
'Konference'	184,72	409,28	245,05	176,96	247,60	183,50	349,22	172,56	183,48	190,49	374,10	441,23
'Williamsova červená'	201,26	553,48	224,77	179,90	195,29	170,97	299,32	183,63	172,62	189,38	546,92	495,80
'Williamsova'	183,11	414,03	216,05	164,50	196,83	176,18	344,82	158,23	163,96	183,87	242,98	447,47
'Charneuská'	233,00	421,25	224,29	216,43	196,24	182,50	297,97	156,78	163,92	169,27	388,67	507,98
'Lucasova'	227,85	371,30	183,90	183,43	187,37	184,13	339,45	151,54	195,03	187,31	372,13	452,63
'Highland'	187,44	252,45	158,61	212,37	190,38	234,32	283,45	174,34	168,89	177,74	377,52	486,47
'Grosdemange'	135,81	292,38	116,89	205,93	193,45	165,76	292,23	133,46	160,40	174,53	332,72	359,95
'Thirriotova'	221,80	344,87	190,42	218,97	190,96	204,67	302,66	150,46	166,66	181,25	364,52	527,15
'General Leclerc'	217,41	148,62	159,08	201,83	197,10	220,11	228,58	169,19	149,30	196,58	421,62	227,35
Štěpka	126,83											

Grafické znázornění:



3.5.1. Jabloň

Všeobecně byl zaznamenán největší záchyt fenolických látek v jarním období a to zejména v listí a pupenech. Napříč celým vegetačním obdobím bylo největší zastoupení fenolických látek zaznamenáno v listí. V 10 odrůdách byla zjištěna koncentrace 164,25 mg/g - 228,85 mg/g v listech, 48,76 mg/g – 73,01 mg/g v kůře, 96,57 mg/g – 176,45 mg/g v pupenech a 74,91 mg/g – 132,43 mg/g v květech v jarním období. V tomto období byla zjištěna i nejvyšší celková antioxidační aktivita. S jistotou lze říci, že majoritní fenolickou látkou byl ve všech případech floridzin. Nejvíce bohatou odrůdou z hlediska fenolických látek je selektována odrůda 'Rubinstep', která vykazuje i vysokou antioxidační aktivitu a má tedy i nejvyšší zdravotní potenciál při zpracování rostlinného materiálu. Štěpka obsahovala v průměru 50,73 mg/g.

3.5.2. Hrušeň

U materiálu z hrušně bylo všeobecně zjištěno největší množství fenolických látek rovněž v jarním období. V tomto období byla zjištěna i vysoká celková antioxidační aktivita, ta ale byla vyšší v letním období. Největší zastoupení fenolů bylo zaznamenáno opět v listí. V 10 odrůdách byla zjištěna koncentrace 85,04 mg/g – 161,69 mg/g v listech, 15,74 mg/g – 40,49 mg/g v kůře, 48,28 mg/g – 71,01 mg/g v pupenech a 45,44 mg/g – 63,43 mg/g v květech. Hlavními fenolickými látkami ve všech vzorcích byly arbutin a kyselina chlorogenová. Naopak v žádném vzorku nebyla nalezena 1,5-dikafeoylchinová kyselina. Nejvíce bohatou odrůdou z hlediska fenolických látek je odrůda 'Konference', která vykazovala i vysokou antioxidační aktivitu a má tedy i potenciálně velký zdravotní přínos. Směsný vzorek štěpky obsahuje nezanedbatelné množství fenolických látek (23,08 mg/g).

4. ZÁVĚR

Byly vyvinuty a validovány dvě nové screeningové HPLC-DAD metody pro separaci hlavních fenolických látek v materiálu pocházejícího z ovocných stromů. Pro stanovení celkového množství antioxidantů byly metanolické extrakty změřeny pomocí průtokové metody s elektrochemickou detekcí pro rychlé meziodrůdové porovnání.

Studovanými ovocnými stromy byly jabloně a hrušně. Sledovaným materiálem bylo listí, kůra, pupeny, květy a štěpka. Ve zmiňovaném materiálu je enormní množství fenolických látek s velkou antioxidační aktivitou. Koncentrace fenolických látek v biomase ovocných stromů je mnohonásobně vyšší než v samotných plodech. Naše studie odhalila až stovky mg/g v listech a dalším materiálu ovocných stromů, což je několiknásobně víc než v plodech. Největší koncentrace se vyskytují v jarním období. Nejpřínosnějšími odrůdami zjištěných v této studii jsou 'Rubinstep' (jabloň) a 'Konference' (hrušeň), které tak mají největší přínos pro lidské zdraví.

Majoritními fenolickými látkami jsou floridzin (jabloň), arbutin a kyselina chlorogenová (hrušeň). Velký potenciál floridzinu spočívá ve snížení hyperglykemie. Arbutin se používá hlavně pro snížení pigmentace kůže a k eliminaci pih. Své uplatnění nachází hlavně v kosmetickém průmyslu. Kyselina chlorogenová má příznivé účinky při hypertenzi a využívá se při hubnutí. Je také častou majoritní složkou potravních doplňků pro redukci hmotnosti, a tudíž její levný zdroj ve formě listů z hrušně má značný ekonomický potenciál. Všechny analyzované látky jsou zároveň antioxidanty a eliminují volné radikály a mají protinádorové, antimikrobiální a protizánětlivé vlastnosti.

Oproti jiným materiálům je listů snadno dostupné a jeho odběr nenarušuje vývin stromů. Listů pocházející především z jarního období by tak mohlo posloužit k recyklaci a tvorbě nového produktu, například ve formě extraktů, či čajových směsí a potravních suplementů s následujícím využitím v potravinářském, farmaceutickém či kosmetickém průmyslu a posílit tak ekonomickou situaci pěstitelských podniků.

5. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPU

Předložená metodika popisuje originální nově vyvinuté a validované analytické metody pro chromatografickou separaci hlavních fenolických látek v biomase ovocných stromů. Obě metody využívají efektivní separaci na moderních stacionárních fázích s technologií částic s pevným jádrem a nejsou pro tuto aplikaci dosud v odborné literatuře popsány. Záměr nové metodiky je cílen nejen na chemickou analýzu vybraných fenolických látek a dalších antioxidantů, ale hlavně seznamuje se zemědělským materiálem bohatým na bioaktivní látky, který se hojně vyskytuje, ale není doposud téměř vůbec využíván. Taková publikace nebyla dosud poskytnuta pěstitelům ovocných stromů, zpracovatelským podnikům či producentům kosmetiky a doplňků stravy.

6. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Předložená metodika je určena pěstitelům ovocných stromů, zpracovatelským podnikům a producentům potravních doplňků či kosmetických preparátů. Metodika je užitečným zdrojem souhrnných informací o analytických metodách stanovení fenolických látek a antioxidantů až po možné využití materiálu z ovocných stromů. Vzhledem ke zvýšené poptávce o produkty s vysokým obsahem zdravých prospěšných látek, lze očekávat i zvýšený zájem o analýzu rostlinného materiálu, který je potenciálním zdrojem těchto látek. Roste zájem o zdravý životní styl či recyklaci nevyužitých materiálů s cílem šetřit životní prostředí. Spotřebitelé hledají možnosti prevence proti nemocem. Na základě získaných výsledků a popisu dané metodiky lze říci, že materiál ovocných stromů, především listů v jarním období, je bohatým zdrojem bioaktivních látek. Tento materiál lze tedy dále využít ve formě extraktů, výluhů, čajových směsí a pro případný vývoj dalších doplňků stravy. Vysoký potenciál díky obsahu bioaktivních

látek má mezi testovanými jabloněmi odrůda 'Rubinstep' a mezi testovanými hrušněmi odrůda 'Konference'. Rostlinné produkty získané z těchto odpadních materiálů představují další možnost, jak přinést do lidské výživy alternativním způsobem látky podporující lidské zdraví.

7. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Fenolické látky a jiné antioxidanty tvoří důležitou složku zdravé výživy a jejich konzumace prokazatelně příznivě ovlivňuje lidský organismus. Jejich hlavním zdrojem je v současné době především ovoce a produkty z něj. Jejich spotřeba roste, nicméně jejich produkce je ovlivněna klimatickými vlivy. Z posledního šetření Českého statistického úřadu (ČSÚ) z roku 2017, které zahrnovalo 1 755 pěstitelů ovoce, je celková výměra ovocných ploch cca 15 473 ha. Nejvýznamnějším ovocným druhem byly jabloně pěstované na celkové ploše 7 819 ha (47,6 %) s průměrnou hustotou 1 322 jabloní na hektar. Výměra hrušňových sadů představuje 870 ha (5,3 %). Každý strom nabízí materiál s následným potenciálním využitím.

Biomasa ovocných stromů představuje doposud nevyužívaný zemědělský a hojně se vyskytující materiál. Oproti jiným materiálům je však listí snadno dostupné a jeho odběr nenarušuje vývin ovocných stromů. Listí by tak mohlo sloužit jako zdroj cenných bioaktivních látek ve formě extraktů či potravních suplementů s uplatněním v kosmetickém, potravinářském či farmaceutickém průmyslu.

Spotřeba doplňků stravy v ČR stoupá každým rokem. Dle studie za ně Češi zaplatili v roce 2015 zhruba 2,2 mld. Kč a predikce na rok 2020 byla 2,5 mld. Kč [19].

Tyto informace mohou být využity pěstiteli ovocných stromů a zpracovatelskými podniky, které tak mohou zvýšit nabídku svých služeb o distribuci svých nových produktů do kosmetických, farmaceutických a potravinářských firem a zlepšit svou ekonomickou situaci.

8. ZDROJE

Publikace předcházející metodice:

- ŠÍROVÁ, K.: Analýza nutričně významných látek v odpadních produktech ovocných stromů pomocí HPLC. Hradec Králové, 2020. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Vedoucí práce Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.
- ŠEBKOVÁ, B.: Sledování dynamiky floridzinu a příbuzných sloučenin v jabloních v průběhu vegetačního období. Praha, 2019. Diplomová práce. Česká zemědělská univerzita v Praze. Vedoucí práce Ing. Jan Táborský, Ph.D.
- JAN TÁBORSKÝ, JOSEF SUS, JAROMÍR LACHMAN, BARBORA ŠEBKOVÁ, ANEŽKA ADAMCOVÁ, DALIBOR ŠATÍNSKÝ: Dynamics of phloridzin and related compounds in four cultivars of apple trees during vegetation period., tč. rukopis odeslán k posouzení.

Seznam použité literatury:

- [1] FALCONE FERREYRA, M.L., RIUS, S. P. et al: Flavonoids: biosynthesis, biological function and biotechnological application. *Frontiers in Plant Science*, 2012, 3, 222
- [2] SPILKOVÁ, J. a kol.: *Farmakognosie*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2016, 102 s., ISBN 978-80-246-3264-3
- [3] NOVÁKOVÁ, L., DOUŠA, M. a kol: *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. 1 vydání. Hradec Králové; Klatovy, 2013, 299 s., ISBN 978-80-260-4243-3
- [4] ŠKEŘÍKOVÁ, V., GRYNOVÁ, L., JANDERA, P.: Využití coulometrického detektoru coularray pro analýzu přírodních antioxidantů. *Chemické Listy* 98. 2004, 343–348
- [5] LIAUDANSKAS, M., ZYMONÉ K. et al: Determination of the Phenolic Composition and Antioxidant Activity of Pear Extracts. *Journal of Chemistry*, 2017, 2017, 1-9
- [6] BRAHEM, M., Catherine M.G.C. RENARD M.G.C. et al: Characterization and quantification of fruit phenolic compounds of European and Tunisian pear cultivars. *Food Research International*, 2017, 95, 125-133
- [7] ANDREOTTI, C., COSTA, G. et al: Composition of phenolic compounds in pear leaves as affected by genetics, ontogenesis and the environment. *Scientia Horticulturae*, 2006, 109, 2, 130-137
- [8] LIAUDANSKAS, M., VIŠKELIS, P. et al: Application of an Optimized HPLC Method for the Detection of Various Phenolic Compounds in Apples from Lithuanian Cultivars. *Journal of Chemistry*, 2014, 2014, 10 pages
- [9] SOWA, A., ZGÓRKA, G. et al.: Analysis of polyphenolic compounds in extracts from leaves of some *Malus domestica* Cultivars: Antiradical and antimicrobial analysis off these extracts. *BioMed Research International*, 2016, 12 pages

- [10] WALIA, M., KUMAR, S. et al: UPLC-PDA quantification of chemical constituents of two different varieties (golden and royal) of apple leaves and their antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2016, 96, 1440-1450
- [11] WILLEMS, J. L., LOW, N. H.: Structural identification of compounds for use in the detection of juice-to-juice debasing between apple and pear juices. *Food Chemistry*. 2018, 241, 346-352
- [12] ÖZTÜRK, A., DEMIRSOY, L. et al: *International Journal of Food Properties* [online]. 2014, 18, 3, 536-546
- [13] FARAH, A., MONTEIRO, M. et al: Chlorogenic Acids from Green Coffee Extract are Highly Bioavailable in Humans. *The Journal of Nutrition*. 2008, 138,12, 2309-2315
- [14] SOTO-HERNANDEZ, M., PALMA-TENANGO, M. et al: Phenolic Compounds - Biological Activity. InTech, 2017 [cit. 2020-03-24] ISBN 978-953-51-2959-2.
- [15] PEDRIALI, C. A., FERNANDES, A. U. et al: The synthesis of a water-soluble derivative of rutin as an antiradical agent. *Química Nova*. 2008, 31, 8, 2147-2151
- [16] PATEL, K., PATEL, D. K.: The Beneficial Role of Rutin, A Naturally Occurring Flavonoid in Health Promotion and Disease Prevention: A Systematic Review and Update. *Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases*. Elsevier, 2019, 2019, 457-479
- [17] SHIROSAKI, M., KOYAMA, T.: Apple leaf extract as a potential candidate for suppressing postprandial elevation of the blood glucose level. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 2012, 58, 1, 63-67
- [18] MAKAROVA, E., GÓRNAS, P. et al: Acute anti-hyperglycaemic effects of an unripe apple preparation containing phlorizin in healthy volunteers: a preliminary study. *Journal of the science of food and agriculture*, 2015, 95, 3, 560-568
- [19] Statista. Value of the dietary supplements market in Europe in 2015 and 2020, by region (in billion euros) [online]. © Statista 2021 [cit. 9.1.2021]. Dostupné z: <https://www.statista.com/statistics/589452/value-dietary-supplements-markets-europe-by-country/>



Ministerstvo zemědělství, odbor zemědělských komodit, Těšnov 65/17, Praha 1, 110 00

v y d á v á

OSVĚDČENÍ

12365/2021-MZE- 18140

o uznání metodiky v souladu s podmínkami Metodiky hodnocení výzkumných organizací a programů účelové podpory výzkumu, vývoje a inovací, schválené usnesením vlády dne 8. února 2017, číslo 107 a její samostatné přílohy č. 4 schválené usnesením vlády dne 29. listopadu 2017 č. 837.

Název metodiky: **Metodika pro identifikaci a detekci bioaktivních látek v rostlinných částech ovocných stromů a odpadní biomase**

Autoři: **Anežka Adamcová a kol.**

Název organizací: **Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova, Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o., RADANAL s.r.o.**

Místo vydání: **Hradec Králové**

Rok vydání: **2021**

Metodika byla vypracována v rámci výzkumného projektu č. **TJ02000196 „Výzkum využití odpadů z ovocných stromů jako zdroje cenných bioaktivních látek“.**

V Praze dne **3.3.2021**

Razítko odborného orgánu státní správy

Jméno zástupce odborného útvaru státní správy:

Ing. Miroslava Czetmayer Ehrlichová

Funkce zástupce odborného útvaru státní správy:

ředitelka odboru zemědělských komodit

.....
podpis zástupce odborného útvaru státní správy

Souhlas ředitele Odboru vědy, výzkumu a vzdělávání MZE:

V Praze dne **11.5.2021**



.....
Mgr. Jan Radoš

pověřen zastupováním ředitele odboru

Poznámky:

METODIKA PRO IDENTIFIKACI A DETEKCI BIOAKTIVNÍCH LÁTEK V ROSTLINNÝCH ČÁSTECH OVOCNÝCH STROMŮ A ODPADNÍ BIOMASE

Autoři: Anežka Adamcová a kol.

Vydal: UNIVERZITA KARLOVA, FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Grafická úprava a sazba: Jan Slezák - OUTSOURCING

Tisk: Reprint s.r.o.

ISBN 978-80-906644-7-0

