

ROSTLINNÉ FENOLOVÉ LÁTKY A FLAVONOIDY

Obsah kapitoly

- Klasifikace, struktura, vlastnosti a výskyt rostlinných fenolových látek
- Stanovení některých skupin fenolových látek: titrační a spektrofotometrické metody
- HPLC fenolových látek: separace, možnosti detekce a identifikace
- Aplikace a příklady stanovení vybraných sloučenin

Strukturní vymezení a vlastnosti rostlinných fenolů

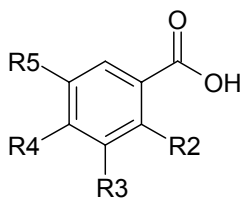
- jedno nebo více aromatických nebo heterocyklických jader (kondenzovaných nebo spojených alifatickým řetězcem)
- jedna, dvě a více hydroxylových (nebo methoxylových) skupin (*polyfenoly*)
- výskyt ve formě glykosidů i aglykonů nejčastěji vázané cukry: Glc, Gal, Rha, Ara, Xyl, Rut
- redukční účinky, antioxidační účinky, chelatační vlastnosti
- substráty reakcí enzymového hnědnutí
- vliv na organoleptické vlastnosti

Skupiny rostlinných fenolů

- fenolové kyseliny a jejich deriváty
- třísloviny
- deriváty kumarinu
- flavonoidy
- isoflavonoidy
- prenylované flavonoidy
- deriváty stilbenu
- ostatní fenolové látky

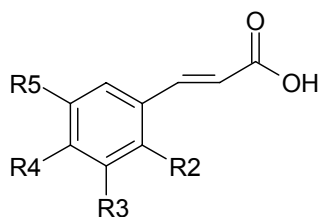
Fenolové kyseliny

Deriváty benzoové kyseliny



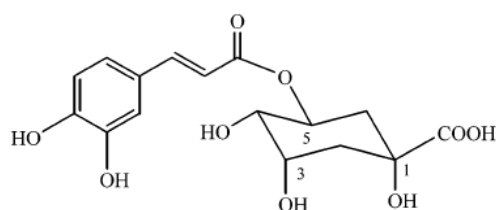
Kyselina	R2	R3	R4	R5
salicylová	OH	H	H	H
<i>p</i> -hydroxybenzoová	H	H	OH	H
vanillová	H	OCH ₃	OH	H
syringová	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
protokatechová	H	OH	OH	H
gallová	H	OH	OH	OH
gentisová	OH	H	OH	H
veratrová	H	OCH ₃	OCH ₃	H

Deriváty skořicové kyseliny



Kyselina	R2	R3	R4	R5
<i>o</i> -kumarová	OH	H	H	H
<i>m</i> -kumarová	H	OH	H	H
<i>p</i> -kumarová	H	H	OH	H
ferulová	H	OCH ₃	OH	H
sinapová	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
káвовá	H	OH	OH	H

Chlorogenová kyselina a příbuzné sloučeniny



5-kaffeoylchinová
(chlorogenová) kyselina

Další kyseliny:

3-kaffeoylchinová (neochlorogenová)

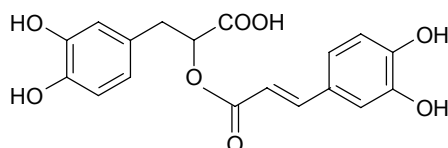
4-kaffeoylchinová (kryptochlorogenová)

isomerní di-kaffeoylchinové kyseliny (isochlorogenové kyseliny)

3-*p*-kumaroylchinová

3-feruloylchinová

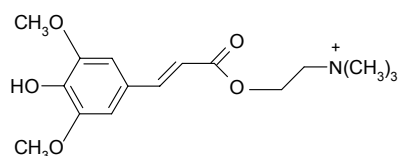
Rosmarinová kyselina



depsid (ester) kávové kyseliny
s kyselinou 2-hydroxy-3-(3,4-dihydroxyfenyl)-propionovou
výskyt: rozmarýna, majoránka

Další deriváty fenolových kyselin

- estery (depsidy) s jablečnou kyselinou (*p*-kumaroyl-, kaffeoyl-, feruloyl-, sinapoylmalát) – výskyt v brukvovitých rostlinách
- estery (depsidy) s vinnou kyselinou
vanilloyl-, *p*-kumaroyl-, kaffeoylvinná kyselina – v moštích a vínech
dikaffeoylvinná kyselina (cichorová, čekanková kys.) – v kořeni čekanky
- cholinestery fenolových kyselin (sinapiny) – hořká a svíravá chuť
sinapin (sinapoylcholin) – semena brukvovitých (zejm. řepky)
p-hydroxybenzoylcholin – hořčice bílá

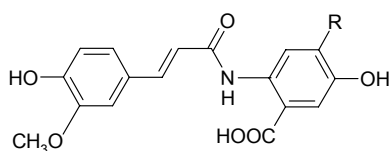


sinapin

- glykosidy fenolových kyselin

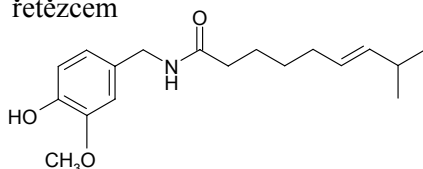
Další deriváty fenolových kyselin

- amidy fenolových kyselin s 5-hydroxyanthranilovou kyselinou
anpř. avenanthramidy v ovsu



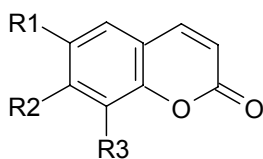
avenanthramid (R je H nebo OCH₃)

- kapsacinoidy – vanillylamidy C₈ až C₁₁ *trans*-monoenoových a nasycených mastných kyselin s rozvětveným i nerozvětveným řetězcem



kapsaicin (výskyt: paprika)

Kumariny



Sloučenina	R1	R2	R3
kumarin	H	H	H
umbeliferon	H	OH	H
herniarin	H	OCH ₃	H
eskuletin	OH	OH	H
skopoletin	OCH ₃	OH	H
fraxetin	OCH ₃	OH	OH

Některé glykosidy:

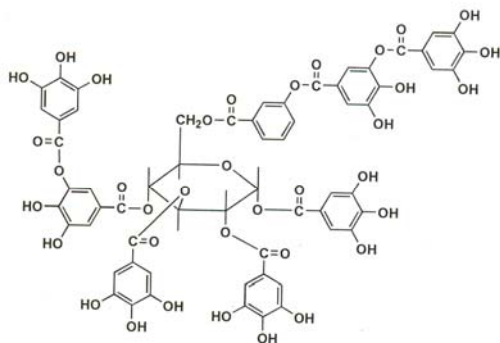
skopolin (skopoletin-7-glukosid)

eskulin (eskuletin-6-glukosid)

Třísloviny

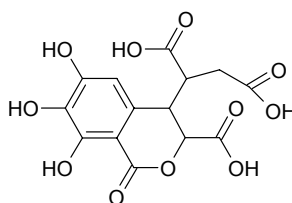
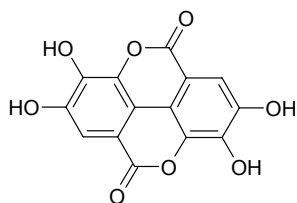
Hydrolyzovatelné třísloviny

Gallotaniny – galloylestery glukosy



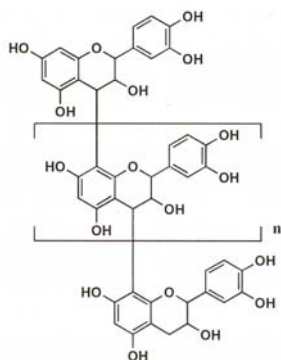
Hydrolyzovatelné třísloviny

Ellagotaniny – deriváty ellagové a chebulové kyseliny



Kondenzované třísloviny

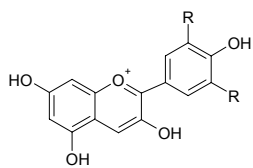
proanthokyanidiny – oligomery katechinů



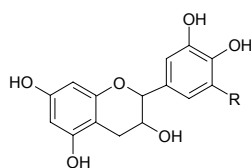
pigmenty fermentovaného čaje – theaflaviny a thearubiginy

Flavonoidy a příbuzné látky

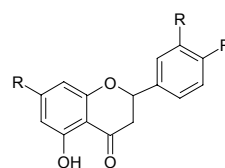
Základní skelet jednotlivých typů



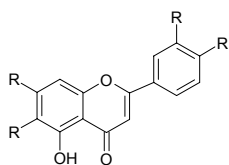
Anthokyanidiny



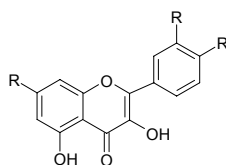
Flavan-3-oly (katechiny)



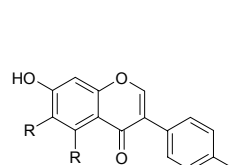
Flavanony



Flavony



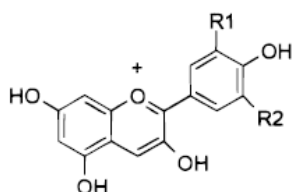
Flavonoly



Isoflavony

Anthokyanany a anthokyanidiny

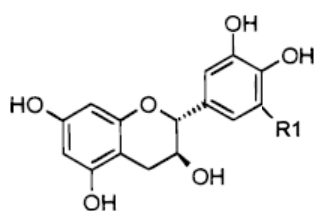
- červená a modrofialová barviva ovoce, květních lístků...
- antokyanany jsou glykosidy anthokyanidinů
- anthokyanidiny jsou aglykony anthokyanů



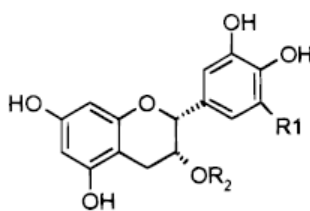
Anthokyanidin	R1	R2
pelargonidin	H	H
kyanidin	OH	H
delfinidin	OH	OH
peonidin	OCH ₃	H
petunidin	OCH ₃	OH
malvidin	OCH ₃	OCH ₃

- glykosylace nejčastěji v poloze 3

Flavanoly (katechiny)



(+)-katechiny



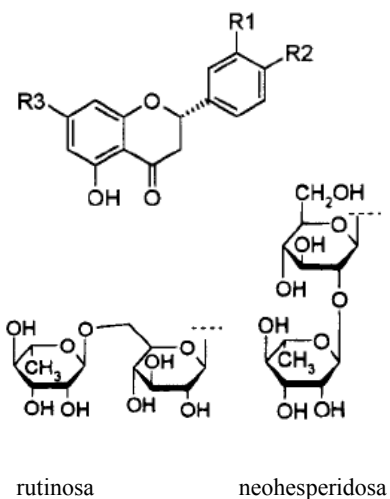
(-)-epikatechiny

		R1	R2
(+)-katechin	(-)-epikatechin (EC)	H	H
(+)-gallokatechin	(-)-epigallokatechin (EGC)	OH	H
	(-)-epikatechin-3-gallát (ECG)	H	Gall
	(-)-epigallogatechin-3-gallát (EGCG)	OH	Gall

Gall je acyl kyseliny gallové

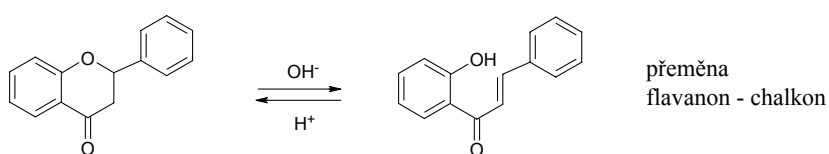
Výskyt: zelený čaj

Flavanony

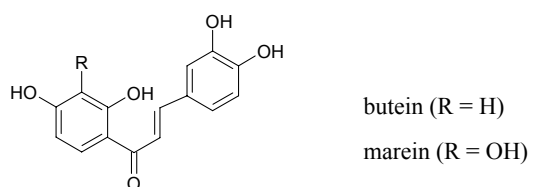


Sloučenina	R1	R2	R3
didymin	H	OCH ₃	ORut
eriocitrin	OH	OH	ORut
eridiktyol	OH	OH	OH
hesperetin	OH	OCH ₃	OH
hesperidin	OH	OCH ₃	ORut
isosakuranetin	H	OCH ₃	OH
naringenin	H	OH	OH
naringin	H	OH	ONeo
narirutin	H	OH	ORut
neociocitrin	OH	OH	ONeo
neohesperidin	OH	OCH ₃	ONeo
pinocembrin	H	H	OH
poncirin	H	OCH ₃	ONeo
prunin	H	OH	OGlc

Chalkony

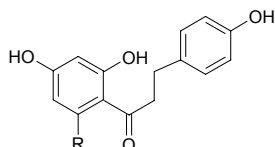


Chalkony – barviva květů, dřeva, semen luštěnin



Dihydrochalkony

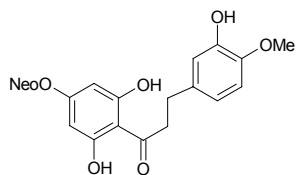
Přirozené dihydrochalkony: floretin a jeho glykosidy – hořká chuť
výskyt – jabloň, stopy v jablkách
(stanovení – důkaz přídavku jablečných šťáv
k jiným šťávám)



floretin (R = OH)

floridzin (R = OGlc)

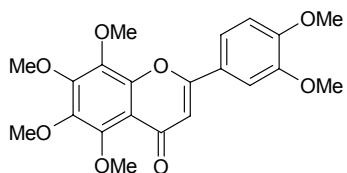
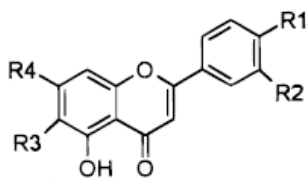
Syntetické dihydrochalkony odvozené od neohesperidinu a naringinu mají
sladkou chuť (náhradní sladidla)



neohesperidin dihydrochalcon

Flavony

žluté pigmenty

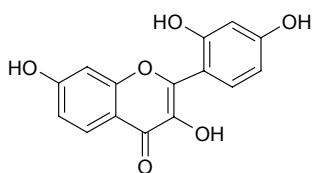
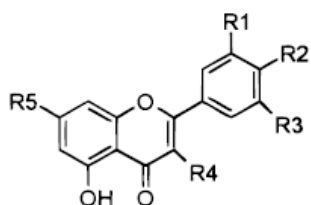


nobiletin - mandarinky

Sloučenina	R1	R2	R3	R4
apigenin	OH	H	H	OH
bajkalein	H	H	OH	OH
chrysin	H	H	H	OH
diosmin (výskyt: máta)	OCH ₃	OH	H	ORut
genkwanin	OH	H	H	OCH ₃
isorhoifolin	OH	H	H	ORut
luteolin	OH	OH	H	OH
rhoifolin	OH	H	H	ONeo
techtchrysin	H	H	H	OCH ₃

Flavonoly

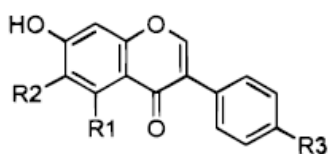
žluté pigmenty



morin – morušovník bílý

Sloučenina	R1	R2	R3	R4	R5
astragalin	H	OH	H	OGlc	OH
hyperosid	OH	OH	H	OGal	OH
isokvercitrin	OH	OH	H	OGlc	OH
isorhamnetin	OCH ₃	OH	H	OH	OH
kemferid	H	OCH ₃	H	OH	OH
kemferol	H	OH	H	OH	OH
kvercetin	OH	OH	H	OH	OH
kvercitrin	OH	OH	H	ORha	OH
myricetin	OH	OH	OH	OH	OH
rhamnetin	OH	OH	H	OH	OCH ₃
rutin	OH	OH	H	ORut	OH

Isoflavony



Sloučenina	R1	R2	R3
biochanin A	OH	H	OCH ₃
daidzein	H	H	OH
formononetin	H	H	OCH ₃
genistein	OH	H	OH
glycitein	H	OCH ₃	OH

7-O-glukosid daidzeinu, genisteinu a glyciteinu se nazývají **daidzin**, **genistin** a **glycitin**.

Existují také acylderiváty těchto glukosidů (6''-O-acetyl- a 6''-malonyl-glukosidy)

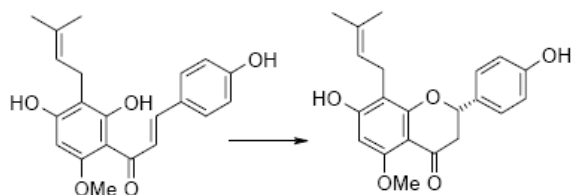
a 6-isopentenylderiváty genisteinu.

Výskyt: sója a další bobovité rostliny.

Isoflavony mají estrogení účinky, některé i antimikrobní účinky (patří k fytoncidům).

Prenylované flavonoidy a příbuzné sloučeniny

Výskyt: chmel

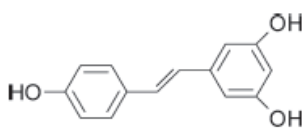


xanthohumol
isoprenylovaný chalkon

isoxanthohumol
isoprenylovaný flavanon

K přeměně xanthohumolu na isoxanthohumol dochází při chmelovaru.

Deriváty stilbenu



resveratrol (*trans*-3,4',5-trihydroxystilben)

výskyt: podzemnice olejná, slupky bobulí

révy vinné, mošty, vína

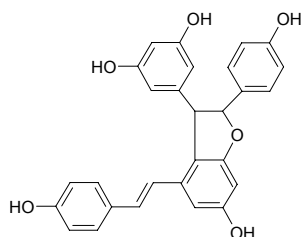
antioxidační účinky

antikarcinogenní účinky, ochrana před

kardiovaskulárními nemocemi

výskyt ve volné formě i formě 3-glukosidu

(zčásti i jako *cis*- isomer)

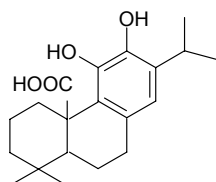


ε-viniferin

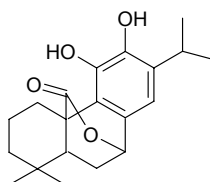
fungicidní účinky

Další fenolové látky

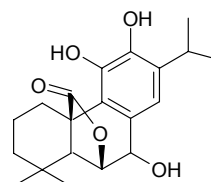
Fenolové diterpeny



karnosová kyselina



karnosol



rosmanol (7- α -OH)
epirosmanol (7- β -OH)

výskyt: rozmarýna, šalvěj

Podobné sloučeniny: isorosmanol, rosmarichinon, rosmaridifenol
(v majoránce)

Skupinová stanovení fenolových látek

Titrační metody

Manganometrické stanovení tříslovin

- neselektivní stanovení látek oxidovatelných manganistanem v nápojích (víno, čajový extrakt)
 - dvojitá titrace vzorku roztokem 0,01M KMnO_4 (titrace v porcelánové misce s indigokarminem jako indikátorem):
 - titrace původního vzorku
 - titrace vzorku po adsorpci tříslovin na polyamid nebo kožní prášek (12-20 hodin)
- výsledek se určí z rozdílu spotřeb násobením empirickým faktorem

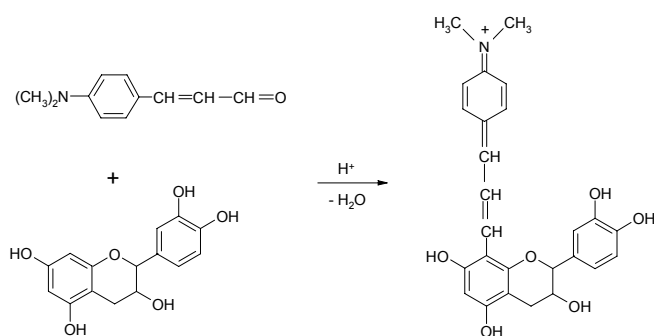
Spektrofotometrické metody

Stanovení celkových polyfenolů reakcí s Fe^{3+}

fenolové látky tvoří s citranem železito-amonným barevné komplexy;
měří se A_{600}

využití: analýza chmele, mladiny, piva
obvyklý obsah v pivu 150-200 mg/l

Stanovení katechinů reakcí s *p*-dimethylaminocinnamaldehydem

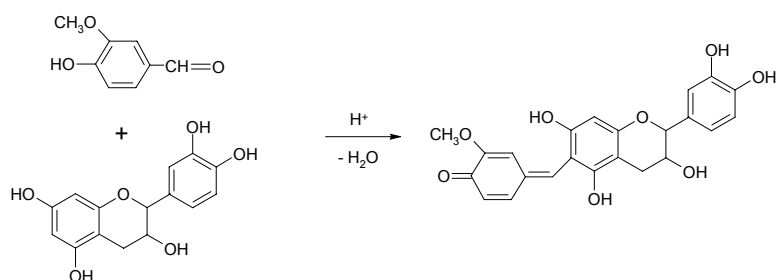


katechiny a jejich glykosidy poskytují s *p*-DMCA zeleně zbarvený produkt
(měří se A_{640})

jiné typy flavonoidů a fenolové kyseliny nereagují

slabě reagují resorcinol, naftoresorcinol, floretin, idoly a terpeny

Stanovení reakcí s vanilinem



červeně zbarvený produkt s vanilinem poskytují katechiny a dihydrochalkony, slabě reagují flavanonoly (dihydrokvercetin)

v silně kyselém prostředí reagují i proanthokyanidiny

Spektrofotometrické stanovení anthokyanů a anthokyanidinů

- zbarvení červené až modrofialové (λ_{\max} 510-540 nm)
- měří buď absorbance v maximu absorpční křivky nebo difference absorbancí (při 500 až 530 nm) roztoků při $\text{pH} \leq 2$ a při $\text{pH} = 3,5$
kvantifikace: standardy pelargonidin (-glukosidu), kyanidin (-glukosidu) nebo na základě známých hodnot ϵ
- jiná možnost: měření komplexů anthokyanů s ionty Al^{3+} nebo Fe^{3+} (vyšší absorbance, posun λ_{\max} cca o +20 nm)

Stanovení proanthokyanidinů

v horké směsi BuOH-konc. HCl (95+5) přecházejí proanthokyanidiny na barevné anthokyanidiny

Stanovení fenolových látek metodami HPLC

Příprava vzorku k analýze

Izolace

- extrakce: voda (vodné roztoky kyselin, solí MeOH, EtOH, aceton, ethylacetát, dimethylsulfoxid...
přídavek antioxidantů (TBHQ, BHA, kys. askorbová)
- enzymová hydrolýza (glykosidázy, proteázy, amylázy)
- kyselá hydrolýza (glykosidy → aglykony)
- alkalická hydrolýza: deacylace glykosidů, EGCG
(dochází k přeměně flavanonů na chalkony)

Přečištění extraktu

- srážení fenolových látek bílkovinami a následná hydrolýza
- extrakce kapalina-kapalina (voda-butanol) – extrakce aglykonů
- gelová chromatografie
- extrakce tuhou fází (SPE)
 - sorpce: polyamid, polyvinylpyrolidon, SiC18, SiC8
anexy (fenolové kyseliny)
 - eluce: ethylacetát a jiná středně polární rozpouštědla
roztoky kyselin (fenolové kyseliny)

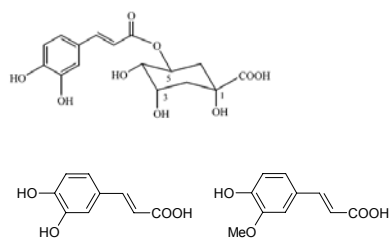
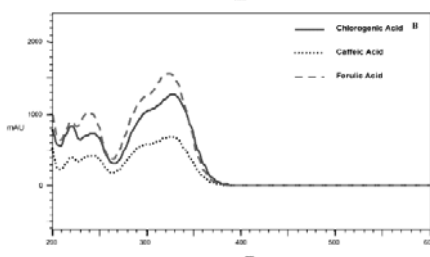
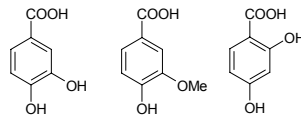
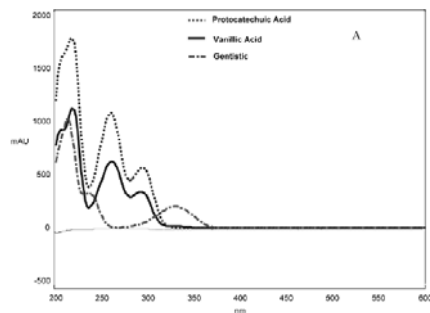
HPLC separace fenolových látek

- **chromatografie na reverzní fázi** – obvykle SiC18
mobilní fáze: voda, vodný roztok HCO₂H, CH₃CO₂H, NH₄CO₂H ...)
organické rozpouštědlo: MeOH, iPrOH, ACN nebo THF
pořadí eluce:
substituované benzoové kyseliny, skořicové kyseliny, flavonoidy
pořadí ve skupině flavonoidů s analogickou substitucí skeletu:
glykosidy anthokyanidinů, flavanonů, flavonolů, flavonů, následované
příslušnými aglykony
pořadí eluce ve skupině anthokyanů a anthokyanidinů:
glykosidy delphinidinu, kyanidinu, petunidinu, pelargonidinu, peonidinu
a malvidinu následované příslušnými aglykony
- **iontoměničová chromatografie** – dělení fenolových kyselin

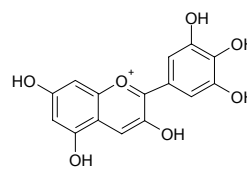
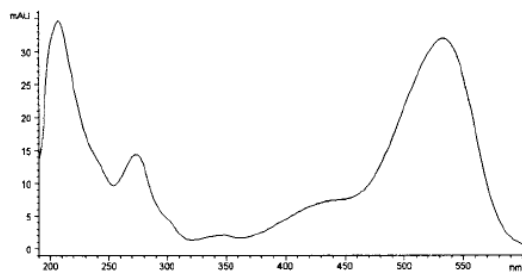
Možnosti detekce fenolových látek při HPLC analýze

- spektrofotometrická detekce (klasické a „diode-array“ detektory)
 - vlastní absorpce analytů:
 - hydroxy-benzoové kyseliny: 270-280 nm
 - hydroxy-skořicové kyseliny: 270-280 nm, 305-330 nm
 - kumariny: 220-230 nm, 310-350 nm
 - antokyany: 500-530 nm
 - flavony, flavonoly a chalkony: 270-280 nm, 310-390 nm
 - isflavony: 245-270 nm, 300-350 nm
 - ostatní flavonoidy: 270-280 nm, 310-350 nm
 - pokolonová derivatizace katechinů – reakce s *p*-DMCA: 640 nm
- fluorimetrická detekce – flavonoidy λ_{ex} 270-310 nm, λ_{em} 310-360 nm
- elektrochemická detekce
 - amperometrický detektor
 - „electro-array“ detektor – řada pracovních elektrod s odstupňovaným potenciálem
- MS

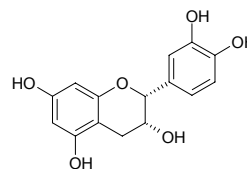
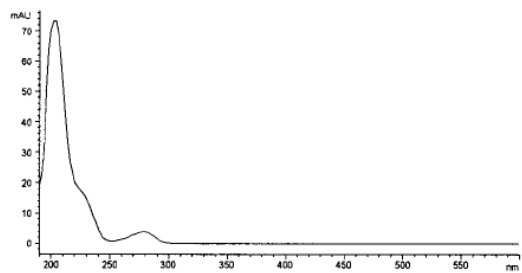
Absorpční spektra fenolových kyselin



Absorpční spektra anthokyanidinu a flavanolu

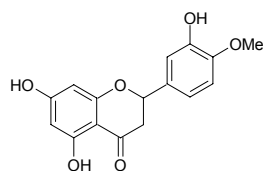
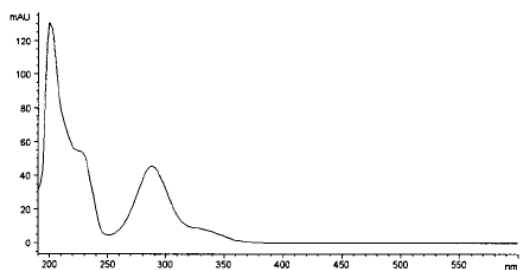


delphinidin

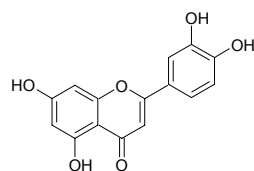
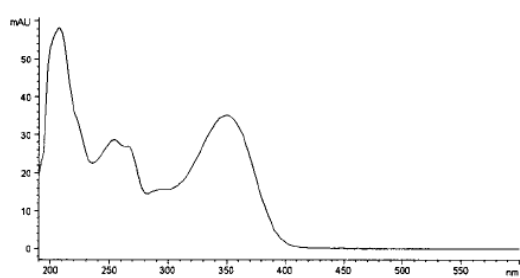


epikatechin

Absorpční spektra flavanonu a flavonu

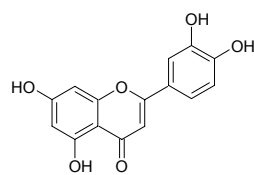
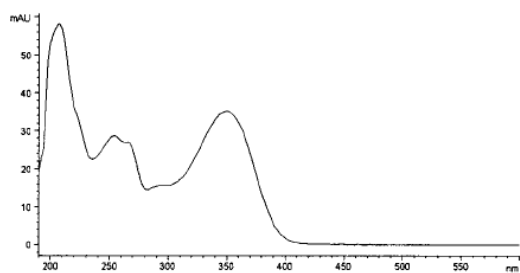


hesperetin

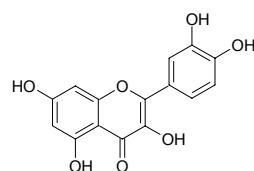
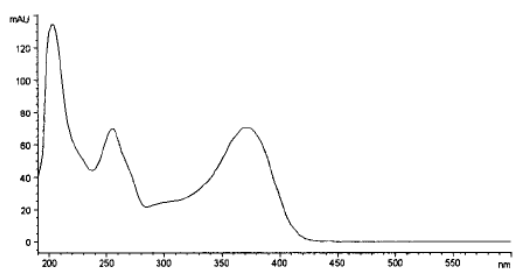


luteolin

Absorpční spektra flavonu a flavonolu

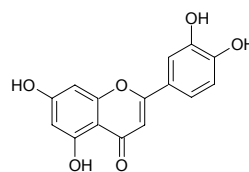
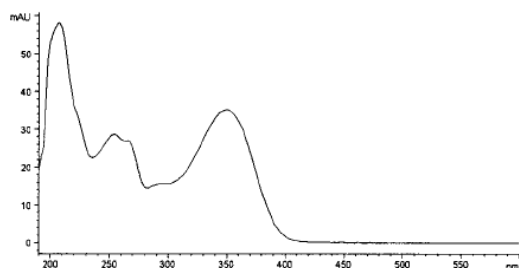


luteolin

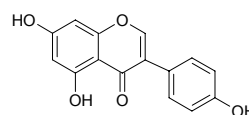
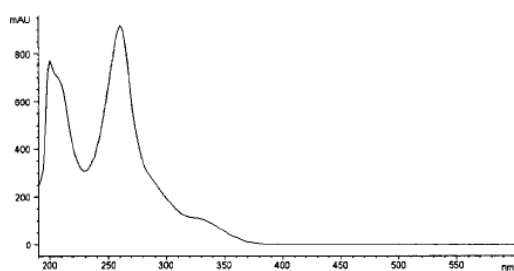


kvercetin

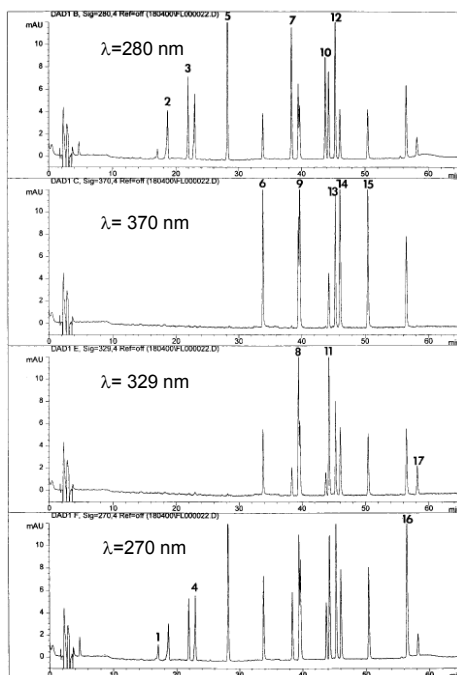
Absorpční spektra flavonu a isoflavonu



luteolin



genistein



HPLC/DAD flavonoidů

Inertsil ODS-3 (4×150 mm, 3 μm), $t = 35^{\circ}\text{C}$

průtok mobilní fáze 0,7 ml/min

A: 50 mM H_3PO_4 , pH = 2,5; B: CH_3CN

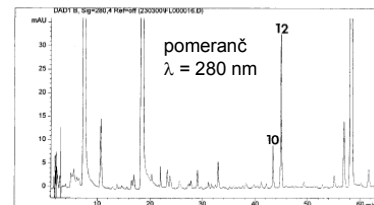
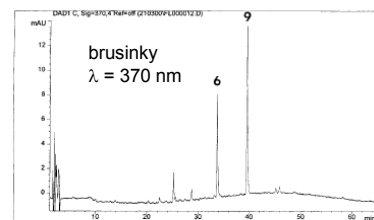
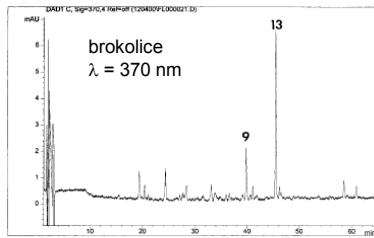
Program: start-5 min: 5 % B,

5-55 min: gradient od 5 do 50 % B,

od 55. do 65. min: 50 % B

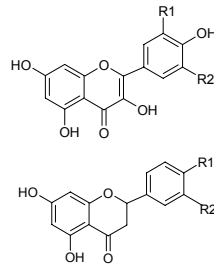
nástrík 10 μl

- 1 epigallokatechin
- 2 katechin
- 3 epikatechin
- 4 epigallokatechingallát
- 5 epikatechingallát
- 6 myricetin
- 7 eridiktyol
- 8 luteolin
- 9 kvercetin
- 10 naringenin
- 11 apigenin
- 12 hesperetin
- 13 kemferol
- 14 isorhamnetin
- 15 rhamnetin
- 16 galangin
- 17 tangeretin



HPLC flavonoidů v reálných vzorcích podmínky jako v předchozím obrázku

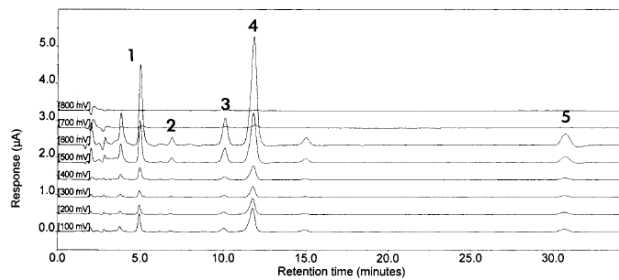
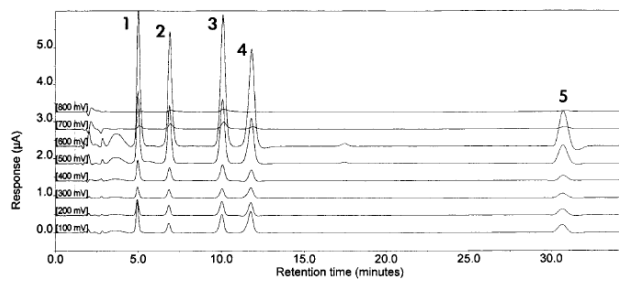
- 6 myricetin
- 9 kvercetin
- 10 naringenin
- 12 hesperetin
- 13 kemferol



Flavonoly
myricetin R1=R2=OH
kvercetin R1=OH, R2=H
kemferol R1=R2=H

Flavanony
naringenin R1=OH, R2=H
hesperetin R1=OCH₃, R2=OH

Příprava vzorku:
extrakce 60 % MeOH (+2 g/l BHA)
probublání dusíkem
hydrolyza s 6M HCl 2 hod při 90 °C
zředění methanolem
filtrace 0,2 μm



HPLC směsi katechinů
amperometrická detekce
electro-array detektorem

Inertsil ODS-3
(4×150 mm, 3 μm), *t* = 35°C
isokratická eluce:
86 % A, 14 % B
A: 50 mM H₃PO₄
B: acetonitril
průtok 0,7 ml/min

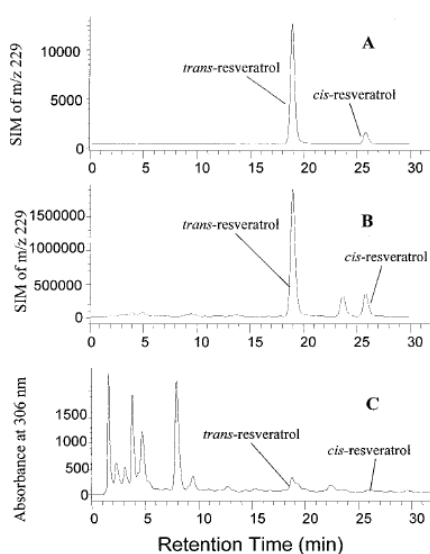
nahore: směs standardů
dole: extrakt zeleného čaje

- 1 epigallokatechin
- 2 katechin
- 3 epikatechin
- 4 epigallokatechingallát
- 5 epikatechingallát

Využití analytických dat

- stanovení fenolových sloučenin jako látek prospěšných zdraví
 - resveratrol
 - epigallokatechingallát, flavonoidy...
- fenolové sloučeniny jako markery druhu suroviny – důkazy falšování potravin
 - naringin (naringenin) vs. hesperidin (hesperetin) – marker přítomnosti grapefruitové šťávy v pomerančové
 - floridzin nebo floretin – marker přítomnosti jablek
 - arbutin (=hydrochinon-glukosid) – marker přítomnosti hrušek
 - chromatografické profily anthokyanových barviv v ovoci – zjištění příměsí jiného druhu ovoce
- stanovení fenolových látek jako antioxidantů nebo sensoricky aktivních látek
 - karnosová kyselina, karnosol... v extraktech bylin
 - sinapin

Stanovení resveratrolu

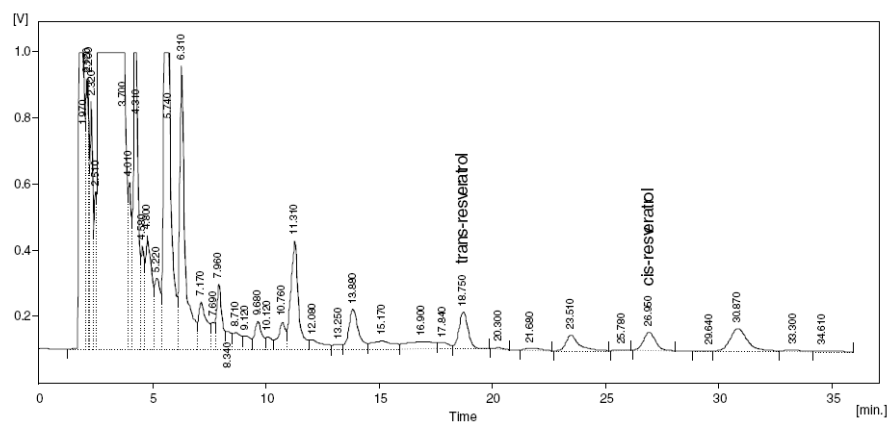


Srovnání LC/MS (A a B) a LC/UV (C) při stanovení resveratrolu

A – standardy *cis* a *trans* isomeru
B, C – vzorek hroznů

Hypersil ODS (2,1×100 mm, 5 μm)
mobilní fáze: A – 0,5 % HCOOH, B – MeOH
gradient od 25 % B do 39 % B
průtok 0,25 ml/min

Příprava vzorku:
homogenizace s vodou
hydrolyza β-glukosidázou
extrakce hydrolyzátu ethylacetátem
odpaření rozpouštědla do sucha
rozpuštění odparku
ve směsi MeOH-0,5 HCOOH (7+3)



Stanovení resveratrolu ve víně metodou HPLC s amperometrickou detekcí
 Nucleosil C18 (4×250 mm, 5 μm)
 mobilní fáze 25 % acetonitril + 5mM NaCl + 0,1 % H₃PO₄
 detekční potenciál 0,75 V