

Flavonolové glykosidy

Markéta Samiecová

Bakalářská práce

2023



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav chemie

Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Markéta Samiecová**
Osobní číslo: **T19822**
Studijní program: **B0721A210002 Technologie a hodnocení potravin**
Specializace: **Chemie a analýza potravin**
Forma studia: **Kombinovaná**
Téma práce: **Flavonolové glykosidy**

Zásady pro vypracování

1. Stručná charakteristika flavonolů a jejich glykosidů.
2. Výskyt flavonolových glykosidů v přírodě a možnosti jejich izolace.
3. Příklady totální syntézy vybraných flavonolových glykosidů.
4. Možnosti stanovení flavonolových glykosidů pomocí instrumentálních metod.
5. Flavonolové glykosidy jako biologicky aktivní látky.

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

1. Velíšek, J.: Chemie potravin, 3. díl. OSSIS, 2002, Tábor.
2. Negahdari, R. et al.: Therapeutic Benefits of Rutin and its Nanoformulations. *Phytotherapy Research* 2021, 35, 1719-1738.
3. Biesaga, M., Pyrzynska, K.: Analytical Procedures for Determination of Quercetin and its Glycosides in Plant Material. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 2009, 39, 95-107.
4. Silva, L. N., Zimmer, K.R., Macedo, A. J., Trentin, D. S.: Plant Natural Products Targeting Bacterial Virulence Factors. *Chemical Reviews* 2016, 116, 9162-9236.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Michal Rouchal, Ph.D.**
Ústav chemie

Datum zadání bakalářské práce: **31. prosince 2022**

Termín odevzdání bakalářské práce: **19. května 2023**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Michal Rouchal, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ AUTORKY BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem na diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků budu uvedena jako spoluautorka.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studentky:

.....
podpis studentky

ABSTRAKT

Flavonoidy představují skupinu látek, které patří mezi rostlinné fenoly. Aktuálně přesahuje počet známých flavonoidních látek hodnotu 4000, a neustále jich přibývá. V různých druzích rostlin se flavonoidy vyskytují částečně volně a částečně ve formě glykosidů.

Předložená bakalářská práce si klade za cíl poskytnout souhrnné informace nacházející se v aktuální odborné literatuře týkající se flavonolů a jejich glykosidů. Jsou v ní charakterizováni vybraní zástupci, se zaměřením se na popis jejich fyzikálně-chemických vlastností, izolaci z přírodních zdrojů, možnosti jejich syntézy a metody stanovení. Stranou není ponechána ani jejich biologická aktivita.

Klíčová slova: flavonoly, flavonolové glykosidy, kvercetin, kaempferol, myricetin, rutin.

ABSTRACT

Flavonoids represent a group of substances that belong to plant phenols. Currently, the number of known flavonoid substances exceeds 4000, and they are constantly increasing. In various plant species, flavonoids occur partly free and partly in the form of glycosides.

The submitted bachelor's thesis aims to provide summary information appearing in the current professional literature regarding flavonols and their glycosides. Selected representatives are characterized in it, focusing on the description of their physico-chemical properties, isolation from natural sources, possibilities of their synthesis and determination methods. Their biological activity is not left out either.

Keywords: flavonols, flavonol glucosides, quercetin, kaempferol, myricetin, rutin.

Velmi ráda bych poděkovala doc. Ing. Michalu Rouchalovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, věcné připomínky, trpělivost a vstřícnost při vypracovávání mé bakalářské práce.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

| | |
|--|-----------|
| ÚVOD | 9 |
| I TEORETICKÁ ČÁST | 11 |
| 1 FLAVONOIDY | 12 |
| 1.1 BIOSYNTÉZA FLAVONOIDŮ | 12 |
| 1.2 FLAVONOLY A JEJICH GLYKOSIDY | 14 |
| 1.2.1 Kvercetin | 18 |
| 1.2.2 Kaempferol..... | 20 |
| 1.2.3 Myricetin | 20 |
| 1.2.4 Rutin..... | 21 |
| 2 ZDROJE FLAVONOLŮ A JEJICH GLYKOSIDŮ V PŘÍRODĚ A MOŽNOSTI JEJICH IZOLACE | 22 |
| 2.1 EXTRAKCE FLAVONOIDŮ | 23 |
| 2.1.1 Konvenční způsoby extrakce | 23 |
| 2.1.2 Nekonvenční způsoby extrakce..... | 24 |
| 3 TOTÁLNÍ SYNTÉZA FLAVONOLŮ A JEJICH GLYKOSIDŮ | 28 |
| 3.1 PŘÍKLADY SYNTÉZY VYBRANÝCH FLAVONOLŮ | 29 |
| 3.1.1 Možnosti syntézy kvercetinu..... | 29 |
| 3.1.2 Možnosti syntézy kaempferolu | 31 |
| 3.1.3 Možnosti syntézy myricetinu | 32 |
| 3.2 PŘÍKLADY SYNTÉZY FLAVONOLOVÝCH GLYKOSIDŮ A JEJICH DERIVÁTŮ | 33 |
| 3.2.1 Rutin..... | 33 |
| 4 MOŽNOSTI STANOVENÍ FLAVONOLOVÝCH GLYKOSIDŮ | 35 |
| 4.1 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE | 36 |
| 4.2 ULTRAFIALOVÁ-VIDITELNÁ SPEKTROSKOPIE..... | 38 |
| 4.3 INFRAČERVENÁ SPEKTROMETRIE..... | 39 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 5 | FLAVONOLY A JEJICH GLYKOSIDY JAKO BIOAKTIVNÍ LÁTKY | 40 |
| 5.1 | KVERCETIN | 40 |
| 5.2 | KAEMPFEROL | 42 |
| 5.3 | MYRICETIN..... | 44 |
| 5.4 | RUTIN..... | 46 |
| 6 | VÝHLED DO BUDOUCNA..... | 48 |
| | ZÁVĚR | 49 |
| | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY..... | 50 |
| | SEZNAM OBRÁZKŮ | 62 |
| | SEZNAM TABULEK..... | 63 |

ÚVOD

Lidé přišli již velmi dávno na to, že mnohé rostliny, které nás obklopují, mohou být prospěšné nejen pro zahnání hladu, ale také pro lidské zdraví, a že jejich sněžení, usušení či vypití nám může pomoci od mnohých neduhů. Léčebné moci rostlin využívá lidstvo již od pravěku, a pokračujeme v tom i dnes. Rostliny obsahují velké množství různorodých léčivých látek, které mohou pozitivně ovlivňovat nepříznivý stav organismu a pomáhat léčit řadu zdravotních problémů, případně zmírňovat negativní příznaky daného onemocnění. Udává se, že z 250 000 známých druhů vyšších rostlin se pro léčebné účely používá více než 10 000 druhů. Konkrétně v České republice se ze zhruba 3700 taxonů vyšších rostlin využívá aktivně k léčbě přibližně 200 taxonů.

Flavonoidy představují skupinu látek, které patří mezi rostlinné fenoly. Aktuálně přesahuje počet známých flavonoidních látek hodnotu 4000, a neustále jich přibývá. Historie flavonoidů sahá do první poloviny 19. století, kdy byla objevena jejich chemická identita, ale jejich existence je u botaniků a rostlinných fyziologů tradována již po mnohá staletí. Vliv této skupiny látek byl totiž znám mnohem dříve, a lidové léčitelství je využívalo kupříkladu ve formě čajů již před mnoha staletími. Zájem o flavonoidy stoupl v 90. letech 20. století v souvislosti s hypotézou oxidačního stresu, oxidačního poškození organismu a častějším výskytem některých závažných chorob.

Rozšíření flavonoidů v rostlinné říši je značné. Vyskytují se ve vyšších rostlinách, a to zejména v květech, listech a kůře. Velmi hojně je možné je nalézt zejména v ovoci a zelenině (zvláště v jejich slupkách), obilí a ořechách. Významným zdrojem flavonoidů jsou také nápoje obsahující výtažky z rostlin, jako jsou například ovocné šťávy, čaje, víno a pivo. Flavonoidy představují ve vodě rozpustná barviva dávající květům, plodům, méně často i listům, jejich barvu. První zkoumaní zástupci se vyznačovali nápadně žlutou barvou, odkud také vychází jejich název (*flavus* z latinského jazyka se překládá jako žlutý).

Lokalizace flavonoidů v rámci rostlinného pletiva je závislá na konkrétním druhu rostliny. V různých druzích rostlin se flavonoidy vyskytují částečně volně a částečně ve formě glykosidů. Rozpustné glykosidy se nacházejí především ve vakuolách. Glykosidy představují deriváty sacharidů, které vznikají náhradou hydroxylové poloacetalové nebo poloketalové skupiny, a to buď jiným cukerným nebo necukerným zbytkem.

V rámci předložené bakalářské práce nesoucí název „Flavonolové glykosidy“ bude pozornost zaměřena na představení flavonoidů a jejich nejznámějších glykosidů, konkrétně kvercetin, kaempferol, myricetin a rutin. Nejprve bude přiblížena biosyntéza těchto

látek v rámci rostlinných buněk, a následně budou tyto látky blíže charakterizovány. Rovněž bude zmíněno, kde je možné se s těmito čtyřmi konkrétními látkami v rámci rostlinné říše nejčastěji setkat, a prostřednictvím jakých konkrétních metod je možné je z rostlin extrahovat a izolovat.

Jelikož zájem o flavonoidy a jejich glykosidy neustále narůstá z důvodu jejich možných léčivých účinků, bylo během historie nutné zjistit, jak je možné tyto látky uměle syntetizovat. Bude proto demonstrováno, jak lze realizovat syntézu vybraných flavonolů či totální syntézu vybraných glykosidů v laboratorních podmínkách. V poslední kapitole bude popsáno, z jakého důvodu o glykosidy roste v posledních letech zájem veřejnosti i vědecké obce.

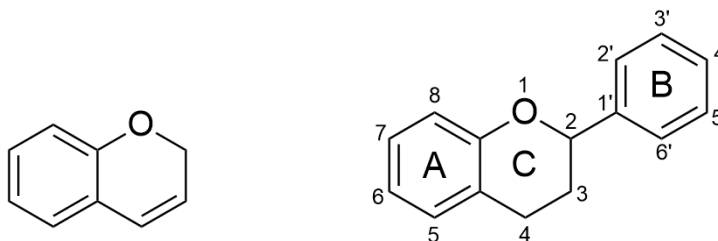
I. TEORETICKÁ ČÁST

1 FLAVONOIDY

Flavonoidní látky představují značně rozsáhlou skupinu rostlinných fenolů. Těmito sloučeninami rozumíme takové, jež mají ve své struktuře obsaženu hydroxylovou funkční skupinu, přímo navázanou na aromatický kruh.¹

Flavonoidy ve své struktuře obsahují tříuhlíkatý řetězec s uspořádáním C₆–C₃–C₆ spojující dva benzenové kruhy (A a B) a kruh pyranový s označením ,C', který je zde heterocyklem. Právě díky přítomnosti atomu kyslíku v heterocyklu disponují flavonoidy svými charakteristickými vlastnostmi. Pro svou odlišnost od dalších fenolových pigmentů jsou flavonoidy uváděny jako samostatná skupina rostlinných barviv.¹

Jak je možno vidět na Obrázku 1, ve většině případů je u flavonoidů C₃ řetězec součástí pyranového kruhu, z čehož vyplývá, že jsou flavonoidy odvozeny od kyslíkaté heterocyklické sloučeniny 2*H*-chromenu (Obrázek 1, vlevo). Ten, je-li v poloze C-2 substituován fenylovou skupinou, je nazýván jako flavan (Obrázek 1, vpravo).¹



Obrázek 1 Strukturní vzorec 2*H*-chromenu (vlevo) a flavanu (vpravo).

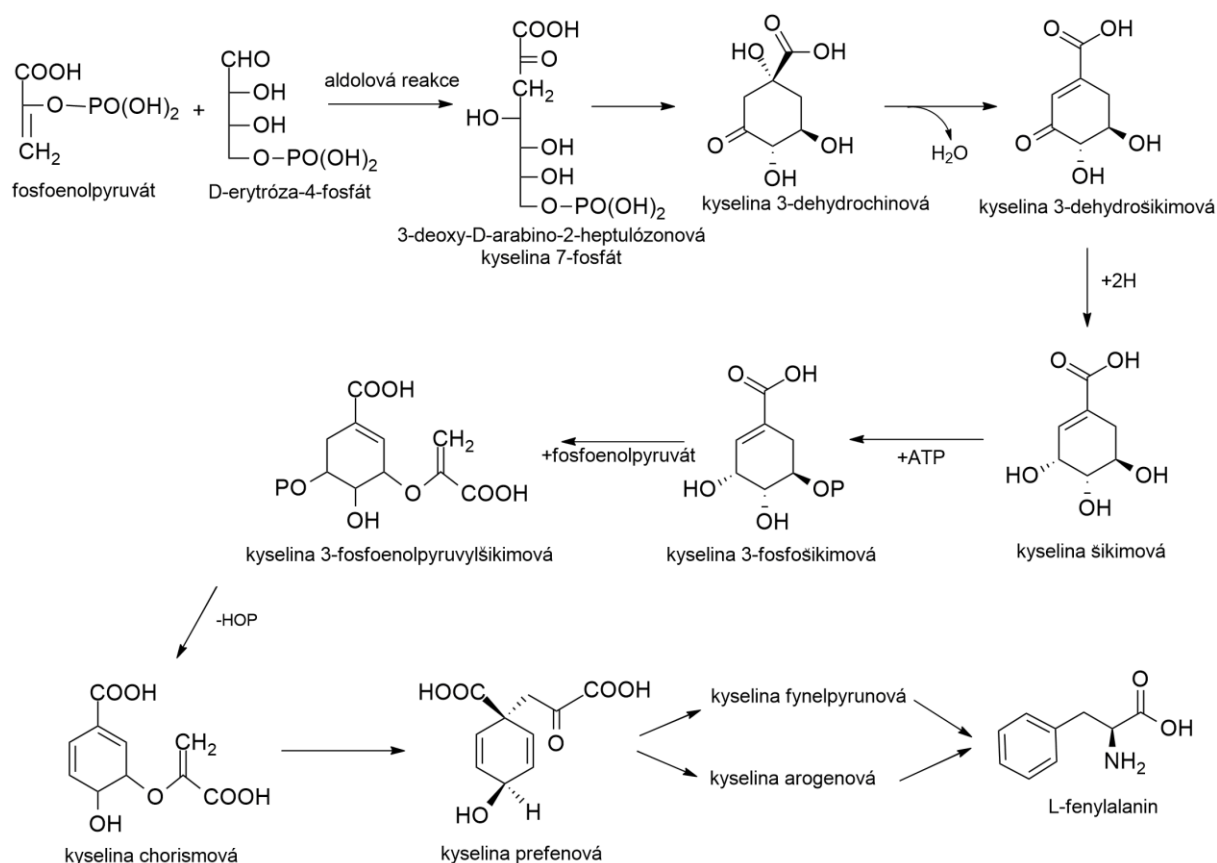
Flavonoidy, v jejichž struktuře je v poloze C-2 navázán kruh ,B', lze dále rozdělit do šesti základních podskupin, díky strukturním znakům kruhu ,C'. Těmito podskupinami jsou flavony, flavonoly, flavanony, flavanonoly, flavanoly nebo katechiny, anthokyany a chalkony.^{2,3}

1.1 Biosyntéza flavonoidů

V rostlinných buňkách jsou flavonoidy obsaženy ve vakuolách. V rostlinách jsou odvozeny ze dvou biosyntetických drah, jež vyvstávají z látkové přeměny kyseliny šikimové (3,4,5-trihydroxycyklohex-1-en karboxylová kyselina). Úlohou této přeměny je tvorba aromatických aminokyselin tryptofanu, fenyloalaninu a tyrosinu. Tento proces probíhá pouze

u rostlin a mikroorganismů. Vzhledem k tomu, že živočichové si aromatické aminokyseliny neboli esenciální aminokyseliny tvořit neumí, je nutné, aby je přijímali z potravy.³

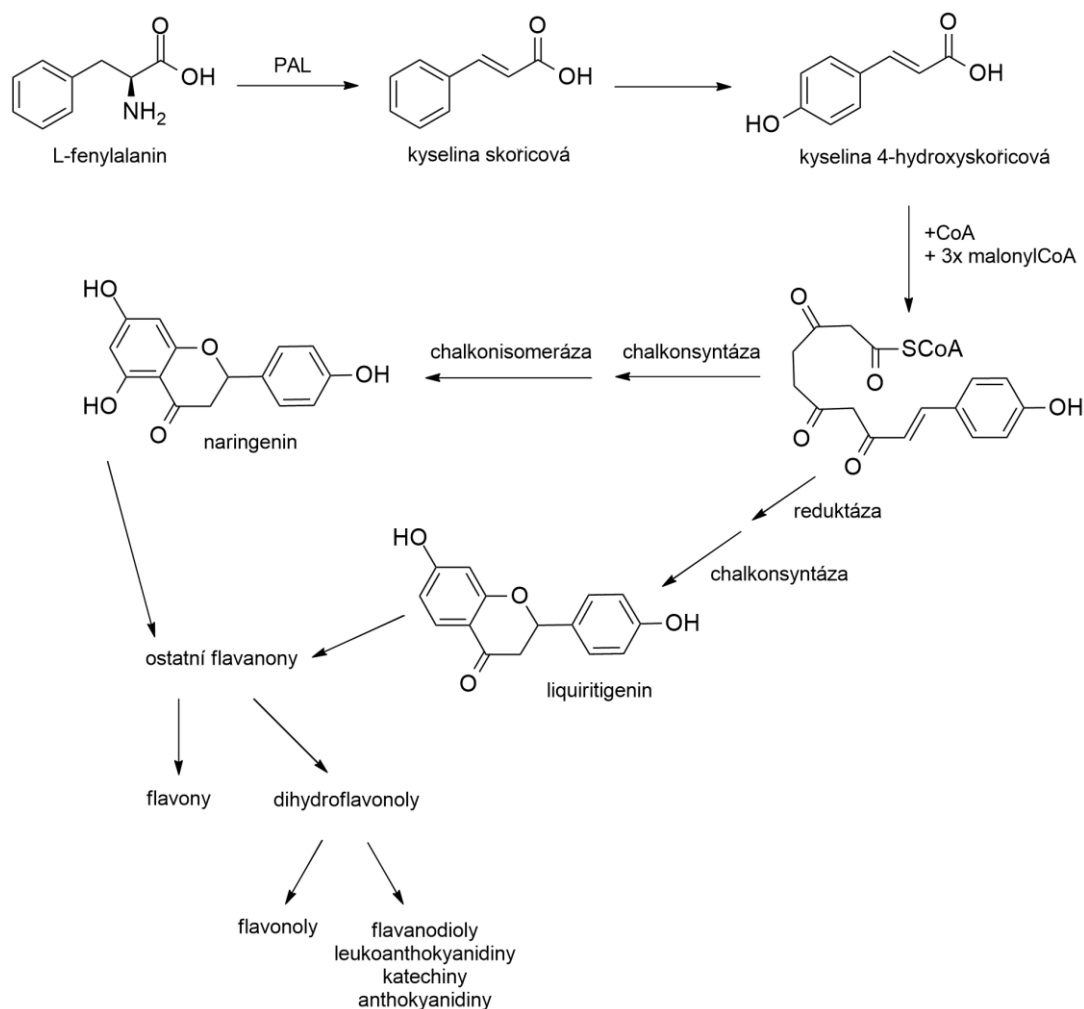
Za sekundární metabolity jsou považovány materiály, které jsou vytvářeny bakteriemi, plísněmi nebo rostlinami. Typické pro ně jsou specifické metabolické procesy, které u živočichů neprobíhají. Jedna z velmi zajímavých reakcí probíhá právě u látek aromatických, jež jsou hojně zastoupeny ve velkém množství organismů. Jak již bylo zmíněno, živočichové je většinou syntetizovat neumí, avšak je možné, aby pro ně byly modifikovány prostřednictvím metabolických procesů. Pokud jsou u živočichů získány potravou, tak je možné si danou aromatickou sloučeninu vytvořit z přijatých prekurzorů. Tvorba je možná například šikimovou cestou⁴, která je znázorněna na Obrázku 2.



Obrázek 2 Šikimová biosyntetická cesta.

Výchozí látkou jedné z biosyntetických cest je L-fenylalanin, který byl vytvořen šikimovou biosyntetickou cestou. Tento se eliminací aminoskupiny, působením enzymu PAL (fenylalanin amonná lyáza; z angl. phenylalanine ammonia lyase) přeměňuje na kyselinu skořicovou, která podléhá další reakci za vzniku kyseliny 4-hydroxyskořicové. Ta

je po přijetí koenzymu A schopna reagovat se třemi molekulami malonyl-koenzymu A, jež vznikly biosyntetickou dráhou acetátu. To má za následek vznik polyketidické sloučeniny, která se prostřednictvím enzymu chalkonsyntázy přemění na naringenin nebo liquiritigenin. Tyto dvě sloučeniny vymezují základní strukturu pro flavonoidy.^{3,5-7} Popsaná biosyntetická dráha je znázorněna na Obrázku 3.



Obrázek 3 Biosyntéza od L-fenylalaninu.

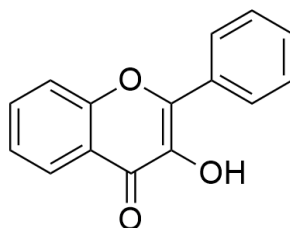
Různé faktory, jimiž jsou například podmínky prostředí, které zahrnují teplotu, světlo či dostupnost vody, dále hormony a fyzické zranění ovlivňují vytlačení genů zapojených do biosyntézy flavonoidů.⁸

1.2 Flavonoly a jejich glykosidy

Flavonoly, jejichž obecná struktura je znázorněna na Obrázku 4, představují skupinu sloučenin strukturně vycházejících z flavonoidního jádra, které se skládá, jak již bylo

zmíněno, ze tří aromatických kruhů označovaných písmeny ,A‘, ,B‘ a ,C‘. Benzenové jádro ,A‘ je kondenzováno šestičlenným kruhem ,C‘, jež v poloze 2 nese fenylový kruh ,B‘. Kruh ,C‘ je odvozen od pyranu, který tvoří základ také flavonům a flavanonům, pro něž se užívá termín 4-oxo-flavonoidy. Flavonoly obsahují, vyjma oxoskupiny na C-4, také skupinu hydroxylovou (na C-3). Jedná se o základní stavební kameny proanthokyanů.¹

Flavonoly jsou žlutě zbarvené pigmenty rostlin, které je možno nalézt ve všech částech rostliny, především pak v listech, květech a vnějších částech rostlin, jimiž jsou kůže a slupka.

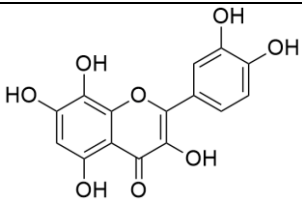
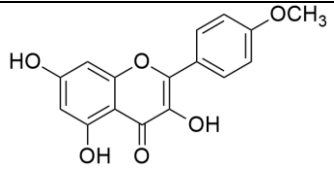
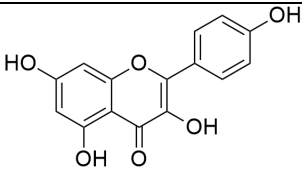
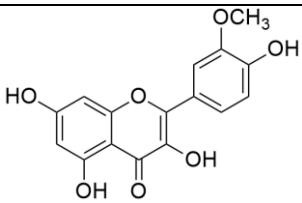
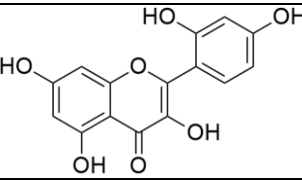
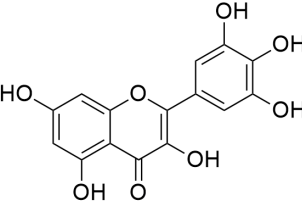
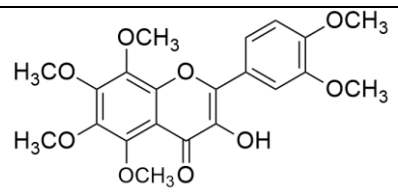
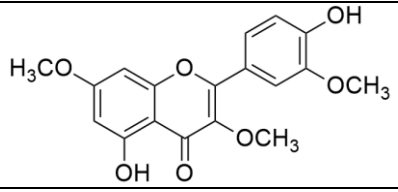
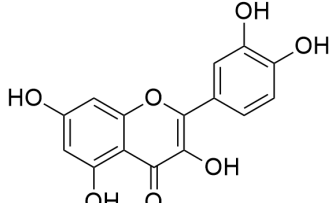


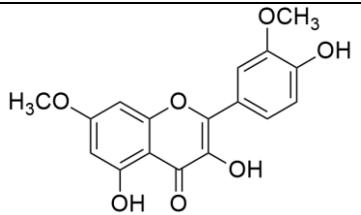
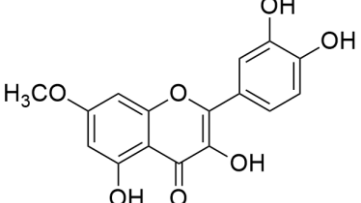
Obrázek 4 Obecná struktura flavonolů.

V současné době je známo 15 flavonolů, mezi nimiž je i 3-hydroxyflavon, jež svou strukturou tvoří pro zbylé flavonoly jakýsi základ, který je možné nalézt ve všech strukturách flavonolů, které jsou představeny v Tabulce 1.

Tabulka 1 Přehled známých flavonolů.

| Název | Systematický název | Strukturní vzorec |
|-----------------|--|-------------------|
| 3-hydroxyflavon | 3-hydroxy-2-fenylchromen-4-on | |
| Azaleatin | 2-(3,4-dihydroxyfenyl)-3,7-dihydroxy-5-methoxychromen-4-on | |
| Fisetin | 3,3',4',7-tetrahydroxy-2-fenylchromen-4-on | |
| Galangin | 3,5,7-trihydroxy-2-fenylchromen-4-on | |

| | | |
|--------------|---|---|
| Gossypetin | 2-(3,4-dihydroxyfenyl)-3,5,7,8-tetrahydrochromen-4-on |  |
| Kaempferid | 3,5,7-trihydroxy-2-(4-methoxyfenyl)chromen-4-on |  |
| Kaempferol | 3,4',5,7-tetrahydroxy-2-fenylchromen-4-on |  |
| Isorhamnetin | 3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)chromen-4-on |  |
| Morin | 2-(2,4-dihydroxyfenyl)-3,5,7-trihydroxychromen-4-on |  |
| Myricetin | 3,3',4',5',5,7-hexahydroxy-2-fenylchromen-4-on |  |
| Natsudaidain | 2-(3,4-dimethoxyfenyl)-3-hydroxy-5,6,7,8-tetramethoxychromen-4-on |  |
| Pachypodol | 5-hydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)-3,7-dimethoxychromen-4-on |  |
| Kvercetin | 3,3',4',5,7-pentahydroxy-2-fenylchromen-4-on |  |

| | | |
|-----------|--|---|
| Rhamnazin | 3,5-dihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)-7-methoxychromen-4-on |  |
| Rhamnetin | 2-(3,4-dihydroxyfenyl)-3,5-dihydroxy-7-methoxychromen-4-on |  |

Takřka univerzálními flavonoly, ve smyslu širokého spektra účinku u prevence a léčby mnoha chorob, jsou kaemferol, kvercetin a myricetin, které se, jak už bylo zmíněno, vyskytují především ve formě glykosidů. Flavonoly jsou pravděpodobně nejběžnější a největší podskupinou flavonoidů vyskytující se v ovoci a zelenině.^{1,2}

Nejběžnější forma, ve které se flavonoly vyskytují, jsou glykosidy. Primárním zástupcem cukerné složky bývá glukóza, avšak je možné najít zástupce i s jinými mono- (např. kaempferitrin, astragalín), di- (např. rutin, hesperidin) a trisacharidy (např. xanthorhamnín).⁸

V současné době je známo 14 flavonolových glykosidů mezi které patří, mimo jiné, i velmi dobře známý rutin. Souhrn všech známých flavonolových glykosidů je popsán v Tabulce 2.

Tabulka 2 Přehled známých flavonolových glykosidů.

| Název | Aglykon | Cukerná část |
|---------------|------------|----------------------|
| Astragalín | Kaempferol | D-glukóza |
| Azaleín | Azaleatin | D-rhamnóza |
| Hyperosid | Kvercetin | D-galaktóza |
| Isoquercitin | Kvercetin | D-glukóza |
| Kaempferitrin | Kaempferol | D-rhamnóza |
| Myricitrin | Myricetin | D-rhamnóza |
| Quercitrin | Kvercetin | D-rhamnóza |
| Robinin | Kaempferol | robinoza, D-rhamnóza |
| Rutin | Kvercetin | rutinóza |
| Spiraeosid | Kvercetin | D-glukóza |

| | | |
|---------------|-------------|--|
| Xanthorhamnín | Rhamnétin | trisacharid |
| Amurensin | Kaempferol | D-glukóza, <i>O</i> -glukosid |
| Icariin | Kaempferide | D-rhamnóza, D-glukóza, <i>O</i> -glukosid |
| Troxeutin | Kvercetin | rutinóza, hydroxyethyl |

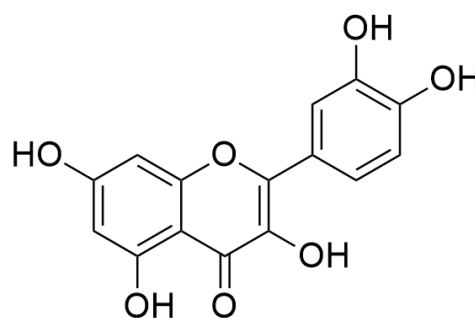
Rostliny obsahující flavonolové glykosidy produkují velké množství sekundárních metabolitů, které mohou být glykosylovány.⁹ Glykosylace metabolitů v rostlinách slouží k mnoha účelům. Po glykosylaci se metabolity, které jsou hydrofobní, stávají lépe rozpustnými ve vodném prostředí, což může vést ke zlepšení jejich metabolismu či biologické dostupnosti.¹⁰

Glykosidy jsou rostlinné stavební látky, které vznikají vazbou cukerné složky – nejčastěji tedy glukózy a necukerné složky geninu, jenž je radikálovým zbytkem. Genin, patřící mezi aglykony, je základním nositelem účinku glykosidů. Glykosidy je možno rozložit kyselinami či některými enzymy. Glykosidová vazba, kterou jsou glykosidy vzájemně spojeny, je etherového charakteru.¹¹

Za nejvíce rozšířené se obecně považují glykosidy strukturně odvozené od kvercetinu a kaempferolu.¹

1.2.1 Kvercetin

Jedná se o aglykon bez připojeného cukru, což znamená, že neobsahuje sacharidovou část. Ze strukturního hlediska se řadí mezi polyfenoly. Obsahuje dvě aromatická difenolová jádra, mezi nimiž je umístěna heterocyklická jednotka obsahující ve své struktuře atom kyslíku (Obrázek 5). Kvercetin a informace o něm lze najít i pod jeho jinými označeními, jako jsou: meletin, kvercetol, soforetin či xanthaurin. Má zářivě citronově žluté zbarvení a je zcela nerozpustný či špatně rozpustný v polárních protických rozpouštědlech, avšak velmi dobře rozpustný v rozpouštědlech polárních aprotických.¹²



Obrázek 5 Strukturální vzorec kvercetinu.

Užívání kvercetinu, ať už v podobě doplňku stravy či přímo z ovoce a zeleniny, ve kterých je obsažen, má pro lidský organismus mnoho benefitů. Je schopen chránit před kardiovaskulárními onemocněními, zmírňuje uvolňování histaminu do krve, dokáže regulovat krevní tlak a v neposlední řadě i regeneruje tkáň.¹³

Kvercetin je získáván z kůry dubu sametového (*Quercus velutina*), díky němuž také kvercetin dostal svůj současný název. Dále se kvercetin využívá jako přírodní barvivo s označením Natural Yellow 10. Získání tohoto přírodního barviva se provádí pomocí extrakce kůry, která je převedena do práškové formy, s amoniakem, kdy je následně extrakt vařen s H_2SO_4 .^{14,15}

Kvercetinový glykosid vzniká připojením glykosidové skupiny za jednu z hydroxylových skupin (obvykle v poloze C-3). Takto připojená glykosidová skupina může ovlivnit fyzikálně-chemické vlastnosti nově vzniklé sloučeniny (např. její rozpustnost ve vodném prostředí).¹²

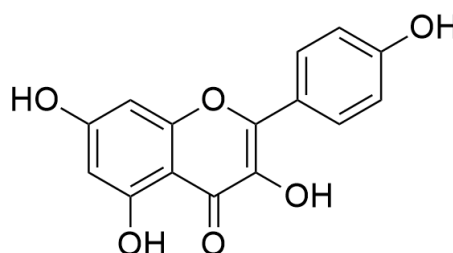
Jednotlivé kvercetinové glykosidy se od sebe odlišují typem připojené glykosidové jednotky. Například hyperosid obsahuje 3-*O*-galaktosidovou skupinu (atom kyslíku navázaný na galaktosidovou skupinu) v poloze C-3, isokvercetin obsahuje 3-*O*-glukosid a rutin má v poloze C-3 připojený disacharid rutin. Všechny uvedené formy představují glykosidy kvercetinu.¹²

Kvercetin je absorbován do střevních buněk právě ve formě již zmiňovaného glykosidu, kde se dále hydrolyzuje na aglykon, který vstupuje do střevního lumenu. Proto jeho transformační proces probíhá především ve střevech.¹⁶

1.2.2 Kaempferol

Jedná se o tetrahydroxyflavon, v jehož struktuře jsou umístěny čtyři hydroxylové skupiny, a to v polohách 3, 5, 7 a 4' (Obrázek 6). Má žlutou barvu, je špatně rozpustný v protických rozpouštědlech.

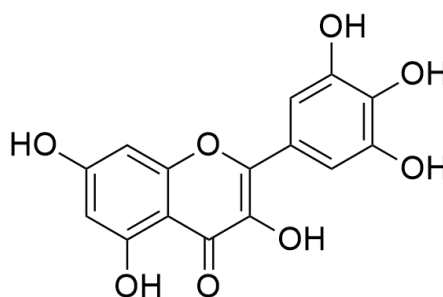
Kaempferol je významným antioxidantem, jenž je schopen předcházet či snižovat oxidační poškození lidských buněk, DNA a lipidů. Rovněž se vyznačuje chemopreventivním působením (dokáže zabraňovat tvorbě karcinogenních buněk).¹⁷ Mezi zástupce glykosidů kaempferolu patří kaempferitrin, robinin, amurensin či astragalín.



Obrázek 6 Strukturální vzorec kaempferolu.

1.2.3 Myricetin

Myricetin (Obrázek 7) patří ve skupině flavonolů k jednomu z nejvíce hydroxylovaných zástupců, jelikož se jedná o hexahydroxyflavon. Jeho rozpustnost ve vodě je špatná, avšak tuto fyzikální vlastnost je možné změnit díky deprotonaci v bazických vodných médiích či v některých organických rozpouštědlech (dimethylacetamid, aceton).¹⁸



Obrázek 7 Strukturální vzorec myricetinu.

Stejně jako většina látek z rodiny flavonolů je i myricetin významným antioxidantem, umí však i zesilovat účinky dalších antioxidantů. Myricetin taktéž dokáže zabránit negativnímu účinku reaktivních forem kyslíku (ROS; z angl. Reactive Oxygen Species).¹⁹

Zajímavostí u myricetinu je fakt, že ačkoliv slouží jako významný antioxidant, má schopnost účinkovat i jako prooxidant, jelikož má schopnost zvýšit tvorbu hydroxylových radikálů.²⁰

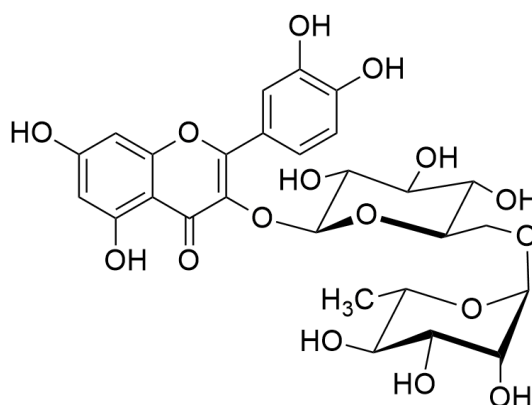
1.2.4 Rutin

Je popisován jako bioflavonoidní glykosid, což znamená, že je to polyfenolová sloučenina nacházející se v mnoha druzích rostlin, a to především v plodech citrusů. Jeho název je odvozen od rostliny *Ruta graveolens*, neboli Roudnice vonná, v níž byl poprvé identifikován.²¹

Strukturně je provázán s kvercetinem, který v jeho struktuře tvoří aglykon, na nějž je navázána sacharidová část, a to v podobě rutinose (Obrázek 8). To znamená, že rutin obsahuje, vyjma dvou fenylových skupin a heterocyklu, v aglykonu také disacharid.

Dříve byl nazýván jako vitamin P, který je hojně obsažen v pohance. Má velkou četnost příznivých zdravotních vlivů, kdy za jednu z nejvýznamnějších je považována schopnost posilovat krevní kapiláry, léčit jejich křehkost a zesilovat elasticitu cév. Redukuje lipoprotein s nízkou hustotou (LDL; z angl. Low Density Lipoprotein), který transportuje cholesterol krví do tkání a jeho účinnost se dá zvýšit kombinací s vitaminem C.

Dále je schopen podporovat léčbu symptomů revmatických onemocnění či degenerativních očních vad. Přírodní, netoxický rutin má schopnost inhibovat nadprodukcii ROS, proto je možné, aby byl považován za užitečný farmaceutický prostředek pro léčbu patologií volných radikálů.^{22,23}



Obrázek 8 Strukturní vzorec rutinu.

2 ZDROJE FLAVONOLŮ A JEJICH GLYKOSIDŮ V PŘÍRODĚ A MOŽNOSTI JEJICH IZOLACE

Flavonoly lze nalézt ve vysokých koncentracích, v desítkách až stovkách $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, například v cibuli kapustě, brokolici, jablkách, lesních plodech, čajích nebo i červeném víně.²⁴ Ovoce a zelenina jsou spolu s vínem a čaji hlavním dietním zdrojem flavonoidů pro lidi, jelikož nejsme schopni si je sami v těle syntetizovat a jejich konzumace je obvykle spojována s žádnou či velmi nízkou toxicitou.^{25,26}

V těchto rostlinách se nachází vysoký obsah flavonolových sloučenin v květech, listech, slupce a kůře, avšak jen malé množství se jich nachází v podzemních částech rostliny (s výjimkou cibule).²⁴ Koncentrace těchto látek závisí na mnoha faktorech, kterými mohou být například genotyp rostliny, podmínky prostředí, ve kterém jsou plodiny pěstovány či vlastnosti půdy.⁸ Flavonoly a jejich glykosidy jsou soustředěny převážně v nadzemních částech rostlin z důvodu závislosti množství flavonolových glykosidů v rostlině na slunci.⁸

Jak již bylo nastíněno výše, tyto látky jsou považovány za velmi významné antioxidanty. Jejich antioxidační aktivita je zapříčiněna zejména přítomností fenylových kruhů nesoucích hydroxylové funkční skupiny. Právě ony volné hydroxylové skupiny jsou schopny poskytnout volnému radikálu atom vodíku a díky tomu se vyhnout procesu oxidace.²⁷

Kvercetin a jeho glykosidy se v přírodě vyskytují celkem běžně. Jak již bylo zmíněno, kumulují se v epidermis rostlin, v květech, listech, stoncích a semenech. To, že se vyskytují v povrchových vrstvách orgánů rostlin, je dáno tím, že jejich biosyntéza je stimulována pomocí světla.^{8,28}

S ohledem na jejich významné antioxidační vlastnosti jsou flavonoidy hojně využívány v kosmetickém, potravinářském i farmaceutickém průmyslu. Avšak aby bylo možné tyto antioxidanty průmyslově využít, je nutno docílit vysoké extrakční čistoty, jelikož tyto extrakty vykazují četnější bioaktivní kapacitu.²⁹

V uplynulých letech byla prozkoumána a popsána řada sofistikovaných metod pro extrakci flavonoidů s cílem získání předmětných látek v maximálním možném výtěžku a čistotě.³⁰

2.1 Extrakce flavonoidů

V současné době jsou akceptovány dva druhy extrakčních technik (pevná extrakce či loužení). Užívanější název těchto dvou technik je extrakce konvenční a extrakce nekonvenční.³⁰

Za konvenční metodu je považována ta, která užívá levná a jednoduchá zařízení, větší množství rozpouštědla a delší dobu extrakce fungující za atmosférického tlaku a při vyšších teplotách. Naopak za metodou nekonvenční lze nalézt extrakci, která je novodobá, ekologická, používající sofistikovanější aparatury, jež jsou navíc schopny ušetřit čas díky schopnosti pracovat při vyšších hodnotách teploty a tlaku.³⁰

2.1.1 Konvenční způsoby extrakce

Nejpoužívanějšími konvenčními postupy vedoucími k zisku bioaktivních látek jsou aktuálně macerace, perkolace, odvar, infuze a tepelný reflux, přičemž nejčastěji používanými rozpouštědly jsou ethanol a voda. Mohou být však používána i jiná, ekologicky méně přijatelná, rozpouštědla jako je methanol, hexan či aceton.^{27,30}

Ethanol, jenž má koncentraci přibližně 60 % se využívá k extrakci flavonolových glykosidů a alkohol o koncentraci vysoké, tj. 90–95 %, je aplikován pro extrakci volných flavonolů.^{30,31}

U výše uvedených metod konvenčních způsobů jsou extrakce prováděny při teplotách nad bodem varu použitého rozpouštědla (reflux), navíc se u většiny zmíněných metod reakce provádí za použití aparatury spojené s atmosférickým tlakem, což je velmi časově náročné a vyžaduje to také velký objem daného rozpouštědla.

Flavonolové glykosidy se extrahují za pomoci metody, která je jednoduše nazvána jako destilace vodní parou. Tato metoda oplývá řadou benefitů, kterými jsou její nízké pořizovací a provozní náklady, vysoký stupeň bezpečnosti nebo nízké nároky na vybavení. Avšak je zde riziko znečištění produktu ve vodě rozpustnými nečistotami, jimiž jsou sacharidy či proteiny.³²

Doby konvenčních extrakcí se u jednotlivých metod značně liší, kdy rozmezí je od desítek minut až po jednotky dnů. Například u metody macerace může činit doba extrakce až 15 dnů. Právě ve spojitosti s délkou trvání jsou, při srovnání s nekonvenčními způsoby, tradiční metody extrakce nevýhodné. Nevýhody jsou taktéž připisovány tepelné degradaci

bioaktivních látek a používání neekologicky šetrných rozpouštědel, u nichž je vyžadována vyšší spotřeba energie. Toto je důsledkem využívání tradičních metod především v kosmetickém, farmaceutickém a potravinářském průmyslu.^{31,33}

Macerace

Jedná se o nejsnadnější typ konvenčního způsobu extrakce. U macerace dochází při laboratorní teplotě k extrakci z pevné fáze do fáze kapalné. Při tomto procesu je celý či rozemletý rostlinný materiál převeden do uzavřené nádoby spolu s rozpouštědlem. Soustava se nechá bez jakéhokoliv zahřívání odstát po dobu několika hodin či dnů, přičemž je nutné její občasné promíchání. Následně se směs odfiltruje, získaný extrakt je pak možné podrobit dalším analýzám.^{34,35}

Destilační extrakce

Řadí se mezi tradiční extrakční metody hlavně u biologicky aktivních sloučenin. Destilace je využívána především pro extrakci těkavých, aromatických látek z rostlinných zdrojů. Jako princip destilace, ať už vodou či vodní parou, je zde transformace kapalné fáze na fázi plynnou. V chladiči destilační aparatury dochází k ochlazení páry a následné kondenzaci. Vodní pára zde slouží jako nosič pro esenciální oleje.^{34,35}

Extrakce dle Soxhleta

Tato extrakce je hojně využívána k rozpouštění z pevných matric u vzorků, které jsou nesnadno rozpustné. Soxhletova extrakce představuje jednu z nejběžnějších extrakčních metod pro izolaci biologicky aktivních látek, barviv i mastných kyselin z rostlinných materiálů. Mezi značné výhody této metody je řazen například opakovaný kontakt vzorku s čerstvým rozpouštědlem, dále lze provádět extrakci většího množství matrice, není třeba další filtrace vyluhovaného vzorku a jedná se o levný způsob.³⁴

2.1.2 Nekonvenční způsoby extrakce

Nekonvenční metody extrakce je možné v obecné rovině rozdělit na: i) metody elektromagnetických sil, ii) mechanické silové metody, iii) enzymatické metody, iv) metody elektrických sil. Poměrně nedávný nástup těchto technik vyzdvihl nekonvenční způsoby extrakce mezi jedny z nejvyužívanějších metod, jež oplývají mnoha výhodami. Těmito mohou být například nižší spotřeba energie, snížená doba extrakce, menší množství

použitého rozpouštědla, vyšší výtěžky a selektivita extrakce, vyšší šetrnost k životnímu prostředí.^{30,36}

Mikrovlnami asistovaná extrakce

Řadí se mezi metodu využívající elektromagnetické síly. I přesto, že u této extrakční metody je dosahováno dobrých výsledků, tak je prozatím využívána pouze ve výzkumných laboratořích, nikoliv v průmyslovém měřítku. Mikrovlnami asistovanou extrakci (MAE; z angl. Microwave-Assisted Extraction) lze kombinovat s jinými metodami pro dosažení co nejvyššího výtěžku produktu, který je extrahován.³⁷

Celkový proces této extrakce je složen z logicky na sebe navazujících kroků. Prvním krokem je oddělení rozpuštěných látek z míst, kde je matrice vzorku aktivní, ta funguje za zvýšeného tlaku a teploty. Jako druhý krok je průběh difúze rozpouštědla skrz vzorek a následné uvolňování látek, jež jsou oddělené a rozpuštěné je krokem třetím.³⁴

Při MAE je využíváno menšího množství organických rozpouštědel, tudíž je metoda řazena mezi ekologicky šetrné. Studie ukázaly, že je díky MAE lze získat daný extrakt ve vyšším výtěžku. Tento fakt byl prokázán například u polyfenolické extrakce kofeinu z listů zeleného čaje.³⁸ Extrakce proběhla ve velmi krátkém časovém úseku – 4 minuty, což je ve srovnání s jinými extrakčními způsoby, kde obdobná extrakce trvá i 20 hodin, velmi prospěšné.^{34,39}

Ultrazvuková extrakce

Jedná se o proces mechanické silové metody, který je schopen šetřit energii. Je využívána při extrakci malého množství flavonoidů či stanovování kvality, proto je extrakční doba krátká s vysokou selektivitou a výtěžky.⁴⁰

Metoda ultrazvukové extrakce je již nějakou dobu známá jako velmi efektivní pro uvolňování biologicky aktivních látek z rostlinných materiálů. Jedná se totiž o proces velice šetrný k termolabilním látkám, protože probíhá za laboratorní teploty. Samotný ultrazvuk se definuje zvukovými vibracemi s kmity, které přesahují hodnotu 20 000 kmitů za sekundu (tj. 20kHz).⁴¹

Základem ultrazvukové extrakce je mechanické šíření vln, které v důsledku změny teploty a tlaku vytvářejí kavitační bubliny. Díky tvorbě kavitačních bublin dojde k vytvoření horkých míst v kapalině, a právě tato místa mohou dosahovat tlaku až 100 MPa a extrémní

teploty (až 5000 K). Výskyt těchto lokálně extrémních podmínek zapříčiňuje destrukci rostlinných buněk tak, že jsou uvolněny biologicky aktivní látky, které jsou přítomny v rostlinných buňkách.^{41,42}

Při srovnání ultrazvukové extrakce s konvenčním způsobem extrakce (macerace) vykazovala extrakce ultrazvuková podobné výsledky při analýze polyfenolových sloučenin, avšak extrakční doba byla kratší (od 6 až do 30 minut) a tudíž proběhla i při nižší spotřebě rozpouštědla.³⁹

Enzymová metoda

Enzymaticky asistovaná extrakce (EAE, z angl. Enzyme-Assisted Extraction) je metoda, která se zakládá na biokatalytické aktivitě enzymů. Primární zákonitostí EAE je oslabení buněčné stěny rostliny za pomoci jednoho nebo více enzymů, které působí právě na onu buněčnou stěnu.⁴²

Procesy, v nichž hrají enzymy hlavní roli, se osvědčily jako efektivní především pro extrakci polyfenolů, a to zejména anthokyanidinů, flavonoidů a k nim náležícím glykosidům. Nevýhodou a omezením u použití této metody je dlouhotrvající extrakce. Například při extrakci enzymů může extrakční doba dosahovat od 30 až do 72 hodin, obvykle je to však přibližně 48 hodin. Zvýšenou pozornost je nutné věnovat také podmínkám, při kterých se extrakce provádí, jelikož některé bioaktivní látky vykazují značnou míru termolability.^{32,43} U EAE prováděnou pro extrakci kvercetinu z listů Guavy jsou typické tyto podmínky: nízká teplota (–50 °C), pH se obecně volí spíše kyselější (pH 5), doba extrakce 12 hodin, jako rozpouštědlo lze použít vodu a směs enzymů–substrát celulóza, xylanáza.⁴⁴

Superkritická fluidní extrakce

Při aplikaci superkritické fluidní extrakce, známé pod zkratkou SFE, se používá k uvedení vzorku do kritického stavu CO₂. První zmínky o využití superkritické extrakce se objevily v 80. letech 20. století, při extrakci látek z rostlinných matric, a to především ve farmaceutickém průmyslu. Účinnost této metody byla ověřena při extrakci polárních (polyfenoly) i nepolárních sloučenin (lipidy, karotenoidy).³⁰

Metoda SFE poskytuje snadněji získatelné a čistější extrakty, než jiné konvenční či nekonvenční metody, jelikož není zapotřebí, aby byly extrakty na závěr celkového procesu zakoncentrovány.⁴⁵

Ultrafiltrace

Při této metodě dochází k separaci molekul o rozdílné molekulové hmotnosti, a to v závislosti na tlakovém rozdílu mezi oběma stranami ultrafiltrační membrány. Proteiny, polypeptidy, polymerní pigmenty a škroby jsou tak při této metodě z velké části odstraněny.⁴⁶

Při ultrafiltrační metodě dochází k záchytu částic o průměru 10–100 nm a nutný rozdíl tlaků před a za membránou není vyšší než 1 MPa. Při této filtraci jsou používány keramické nebo polymerní membrány, ty se pak mezi sebou liší především v ceně a životnosti, dále také v efektivitě, toku a energetické náročnosti.⁴⁶

Mezi nejčastější problémy, které u ultrafiltrace vyvstávají patří koncentrační polarizace. Ta nastává kvůli znečištění membrány na jejím povrchu, naštěstí je situace snadno řešitelná – stačí odstranit usazenou vrstvu nebo míchat vzorek nad membránou.

Patentování ultrafiltrace bylo uskutečněno roku 1969 k účelům pro zpracování mléka.⁴⁶

3 TOTÁLNÍ SYNTÉZA FLAVONOLŮ A JEJICH GLYKOSIDŮ

Pod pojmem totální syntéza si můžeme představit úplné chemické sjednocení komplexních molekul. Tento proces souvisí zejména se strukturně složitými látkami přírodního původu, které se v rostlinném materiálu nachází ve velmi nízkých koncentracích a jejich izolace se může jevit jako složitá a neekonomická. Proto hledají vědecko-výzkumní pracovníci cesty, jak tyto sloučeniny syntetizovat z jednoduchých a komerčně dostupných výchozích látek. V průběhu syntézy mohou vznikat meziprodukty, jejichž následné využití teprve vede k vytvoření požadované molekuly. Takovýto proces se nazývá jako formální syntéza.^{47,48}

Cílem totální syntézy většinou bývá vytvoření přírodní látky v laboratorních podmínkách, za použití dostupných, jednoduchých a levných prekurzorů. Je však nutné, aby byla výsledná molekula nositelem stejných vlastností jako její, v přírodě se vyskytující analog. To znamená, že obsahuje-li originální sloučenina stereogenní centrum (případně centra), musí být v tomto ohledu synteticky připravená sloučenina naprosto totožná. To klade, s ohledem na strukturní rozmanitost a mnohdy i složitost přírodních biologicky aktivních látek, značné nároky na design a samotnou realizaci syntézy uvažované sloučeniny. Jedinou skupinou však nemusejí být pouze látky přírodní, méně často se může jednat i o organokovové nebo dokonce anorganické sloučeniny.⁴⁸

Jak již bylo nastíněno výše, hlavním cílem totální syntézy je objevit efektivní způsob vedoucí k tvorbě konkrétní molekuly, u které jsou však již předtím známy nějaké formy přípravy. U mnoha přírodních látek však není dodnes jasné, jak konkrétně vznikají, proto může totální syntéza představovat i úplně první způsob, jak konkrétní přírodní sloučeninu vytvořit. Proces totální syntézy tak má velký význam při hledání nových druhů synteticky vyráběných přírodních látek.^{47,49}

Proces totální syntézy často sestává z velkého množství různých chemických reakcí a také z rozsáhlého spektra reaktantů. V současné době je připravována celá řada různých sloučenin právě tímto procesem. Jedná se často o skupiny přírodních látek jako jsou alkaloidy, terpeny nebo v této práci rozebírané glykosidy. Totální syntéza je nejčastěji realizována na látkách, které jsou rostlinného původu, popřípadě se nacházejí v houbách či živočišných organismech. V menším množství se v současné době tento postup aplikuje při syntéze přírodních polypeptidů.^{49,50}

3.1 Příklady syntézy vybraných flavonolů

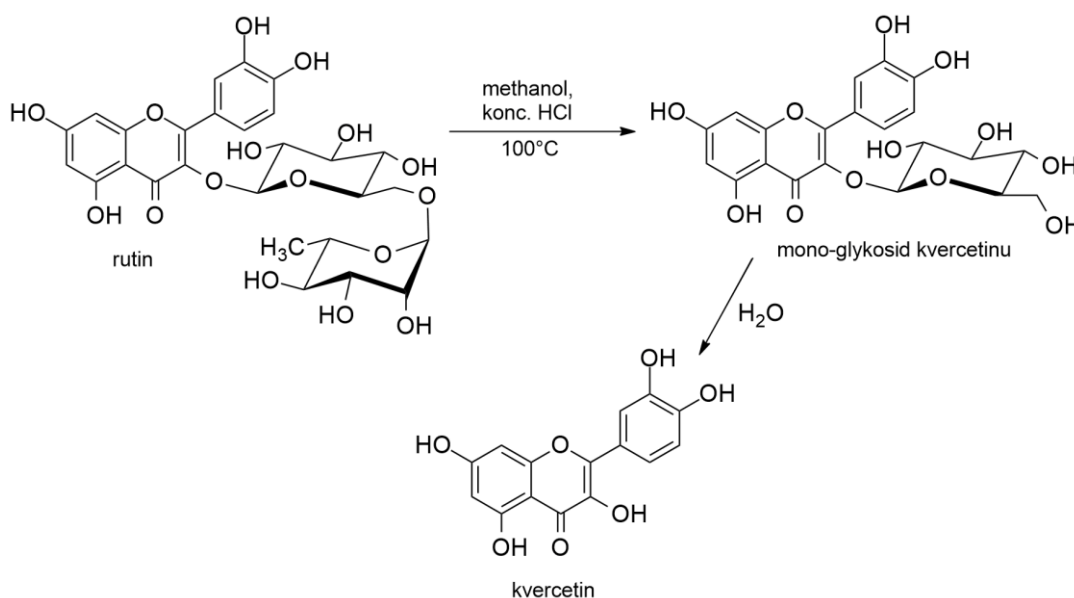
3.1.1 Možnosti syntézy kvercetinu

Kvercetin vzniká díky biosyntetickým procesům v ovoci a zelenině. Poprvé byla tato sloučenina izolována z hrachu setého (*Pisum sativum*).¹⁴

První úspěšná syntéza kvercetinu byla publikována v roce 1962.⁵¹ V prvním kroku byl 2- methoxyacetyl floroglucinolu s anhydridem kyseliny *O*-benzylvanilové v triethylaminu, která dále s KOH vytvořila 5,7-dihydroxy-4'-benzyloxy-3,3'-dimethoxyflavon. Tato sloučenina byla rozpuštěna ve směsi CH₃COOH a HCl. Vzniklé methyl ethery byly rozštěpeny pomocí HI za vzniku kvercetinu.

Syntéza kvercetinu hydrolyzou rutinu

Elena Vladimirovna Větrová *a kol.*⁵² využili metodu hydrolyzy rutinu. Postup hydrolyzy spočíval v rozpouštění 0,10 g rutinu v 1,5 ml methanolu, za přídavku 0,25 ml koncentrované HCl. (Obrázek 9). Teplota reakce se udržovala na 100 °C, a to po dobu 3 hodin. V okamžiku, kdy byla hydrolyza ukončena, byla vzniklá sraženina odfiltrována a získaný filtrát byl následně sušen při 80 °C po dobu 3 hodin.⁵²



Obrázek 9 Syntéza kvercetinu hydrolyzou rutinu.

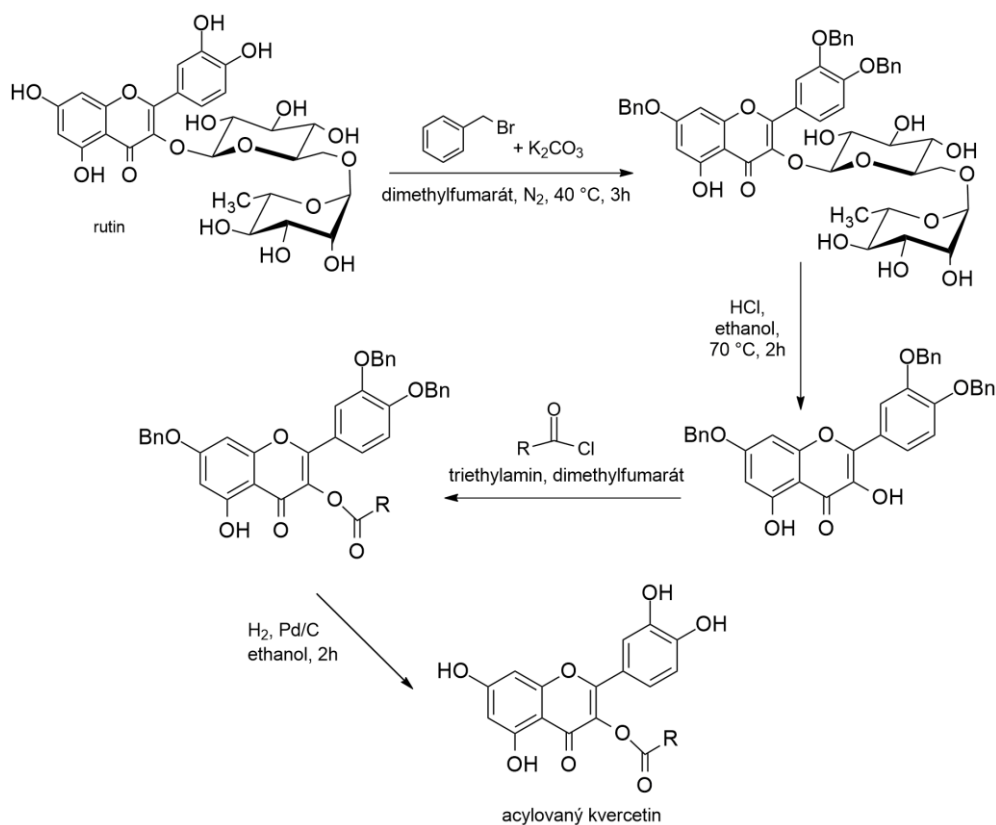
Syntéza acylovaného kvercetinu

Duan *a kol.*⁵³ provedli syntézu acylovaného derivátu kvercetinu, přičemž jako výchozí látka byl opět použit rutin. Syntéza probíhala tak, že rutin (40 mmol) a K₂CO₃ (3,3

ekvivalentu) bylo přidáno do 160 ml dimethylfumarátu za přítomnosti dusíku při laboratorní teplotě. Dále byl do vzniklého roztoku po kapkách přidán benzylbromid (3,3 ekvivalentu). Následně byla provedena úprava pH reakční směsi na 6,0 pomocí 10 % (v/v) kyseliny octové v ledové lázni ke které se dále přidalo asi 300 ml deionizované vody a provedla se filtrace.

Následovalo přidání 600 ml 95 % ethanolu k přefiltrovanému zbytku, za teploty 70 °C, poté se přidala HCl a hydrolyza pokračovala při 70 °C po dobu 2 hodin. Po uplynutí tohoto času byla suspenze zfiltrována a promývána ledovou vodou, až do neutrálního pH, díky čemuž byl získán hydrolyzát. Vzniklý hydrolyzát byl rozpuštěn ve 250 ml dimethylfumarátu, do směsi bylo přidáno ekvimolární množství příslušného chloridu a triethylamin.

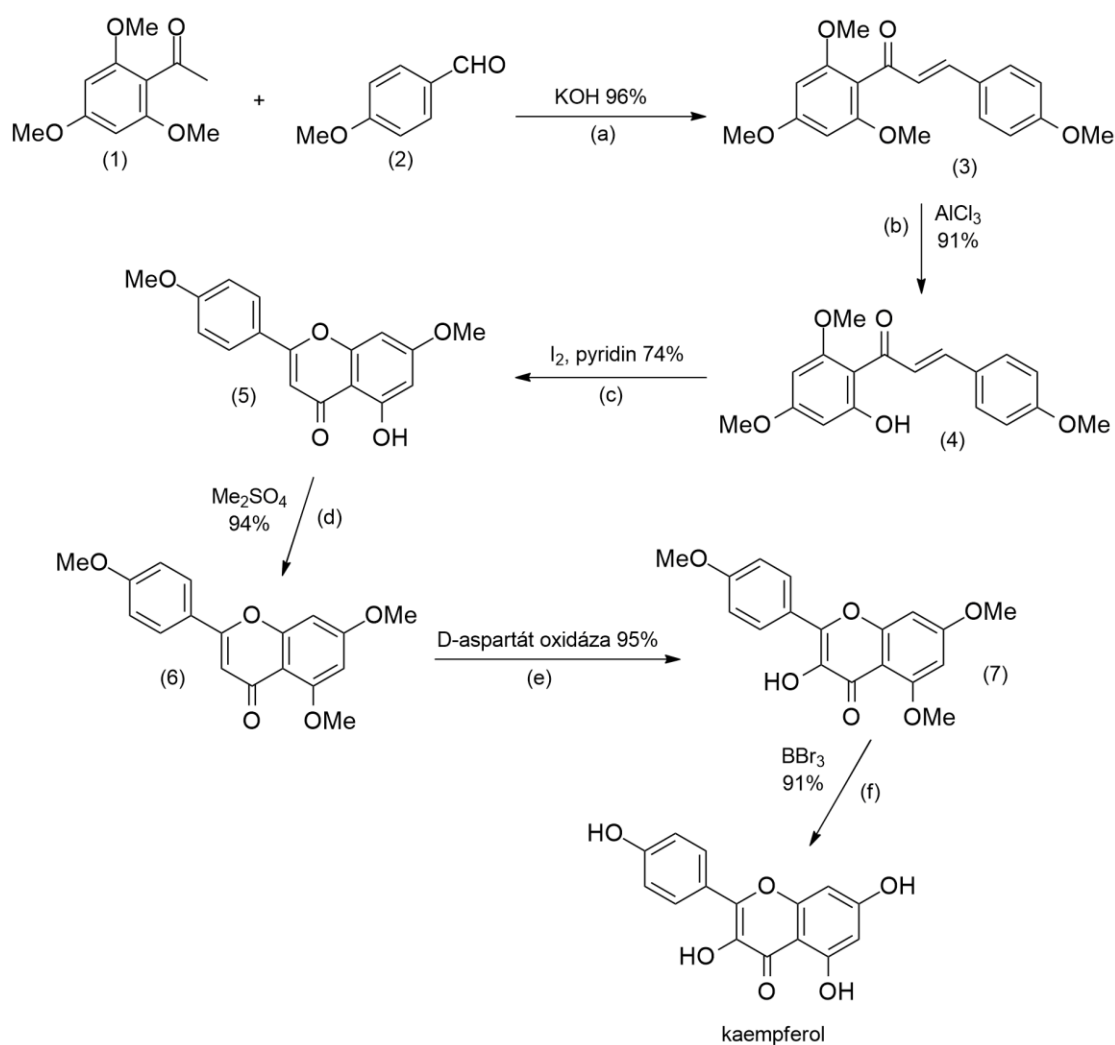
Po dokončení této reakce byla provedena extrakce 1M HCl. Nasycený vodný roztok NaHCO₃ spolu s deionizovanou vodou byly následně využity pro promytí organické fáze. V posledním kroku byla provedena katalytická hydrogenace za použití palladia na uhlíku (Pd/C) za laboratorní teploty v ethanolu. Uvedým sledem reakcí byl připraven požadovaný acylovaný kvercetin (Obrázek 10).⁵⁴



Obrázek 10 Syntéza acylovaného kvercetinu.

3.1.2 Možnosti syntézy kaempferolu

Popis první totální syntézy kaempferolu byl publikován v roce 1976 Vermešem a spolupracovníky.⁵⁵ To zahrnovalo glykosylaci 3-OH kaempferolu. Funkční skupiny polyhydroxyflavonů (7-OH, 4-OH) mají vůči nukleofilní substituci výhodnou reaktivitu. Zlepšení výtěžku a redukce reakčních kroků bylo později dosaženo řízenou benzylací kaempferolu na 7,4-di-*O*-benzylkaempferol.^{56,57}



Obrázek 11 Totální syntéza kaempferolu.

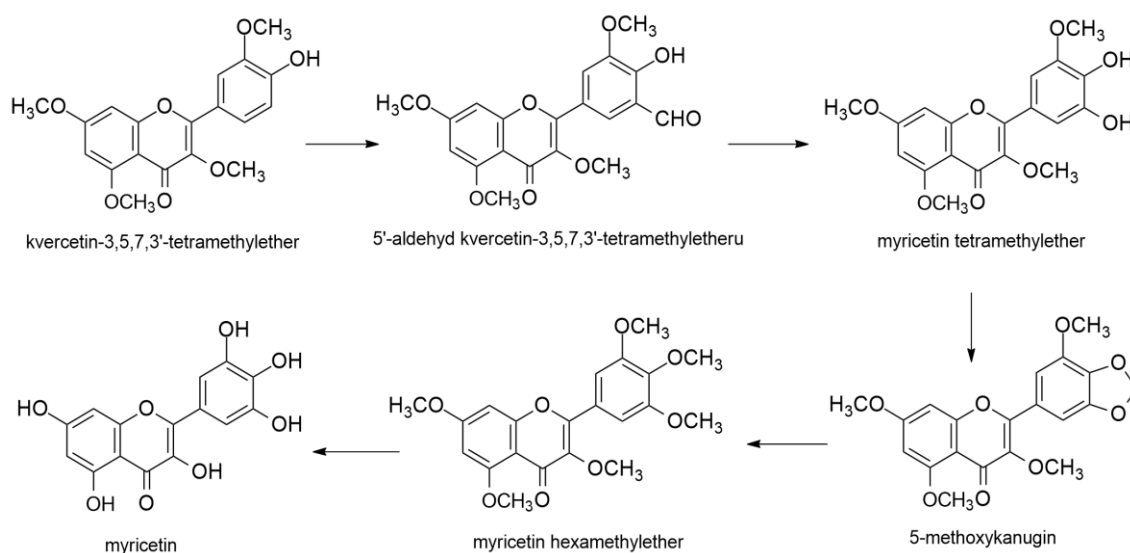
Kaempferol lze ovšem syntetizovat řadou jiných způsobů, například níže uvedenou multikrokovou syntézou (Obrázek 11). Výchozími látkami pro syntézu jsou 2,4,6-trimethoxyacetofenon (1) a 4-methoxybenzaldehyd (2), které reagují za přítomnosti KOH. Tento první krok je nazýván aldolovou kondenzací (a). Druhým krokem syntézy je *ortho*-demethylace (b) vznikajícího 2,4,6,4'-tetramethoxychalkonu (3) za přítomnosti AlCl_3 (b).

Výsledkem tohoto kroku je vznik 2-hydroxy-4,6,4'-trimethoxychalkonu (4), který dále podléhá I_2 zprostředkované oxidativní cyklizaci (c) za vzniku 5-hydroxy-7-methoxy-2-(4-methoxyfenyl)chromen-4-onu (5), který podléhá methylaci (d) pomocí Me_2SO_4 . Dalším krokem je oxidativní hydroxylace 5,7-dimethoxy-2-(4-methoxyfenyl)chromen-4-onu (6), která je katalyzována D-aspartát oxidázou (e). V posledním kroku proběhne řízená katalytická demethylace použitím BBr_3 (f) za vzniku požadovaného kaempferolu.⁵⁸

3.1.3 Možnosti syntézy myricetinu

Velký význam syntézy myricetinu tkví převážně v jeho použití jakožto klíčového výchozího materiálu pro další syntézu jiných prospěšných sloučenin, například hibiscetinu.⁵⁹

První pokus o syntézu myricetinu proběhl již v roce 1925 za použití Auwersovy syntézy, avšak s neúspěšným výsledkem.⁶⁰ Ve stejném roce se Kalffovi a Robinsonovi povedlo syntetizovat myricetin z ω -methoxyfloracetofenonu.⁶¹ Tento způsob zahrnoval zahřívání methoxyfloracetofenonu společně s anhydridem kyseliny trimethylgalové a trimethylgalátem sodným. Po hydrolyze produktu vznikl 5,7-dihydroxy-3,3',4',5'-tetramethoxyflavon, který nakonec po demethylaci poskytl požadovaný myricetin.^{20,61}



Obrázek 12 Příklad syntézy myricetinu.

Využitím alternativní cesty, kterou publikovali Rao a Sheshadri, byla představena syntéza myricetinu z kvercetinu prostřednictvím *ortho*-oxidační reakce (Obrázek 12).⁵⁹ V tomto případě byl výchozí 3,5,7,3'-tetra-*O*-methylkvercetin převeden na odpovídající 5'-aldehyd,

který byl v dalším kroku redukován na odpovídající alkohol s následnou cyklizací za vzniku 5-methoxykanuginu. Hydrolýza této látky s následnou methylací poskytla hexamethoxymyricetin, jehož demethylací byl získán požadovaný myricetin.⁶¹

3.2 Příklady syntézy flavonolových glykosidů a jejich derivátů

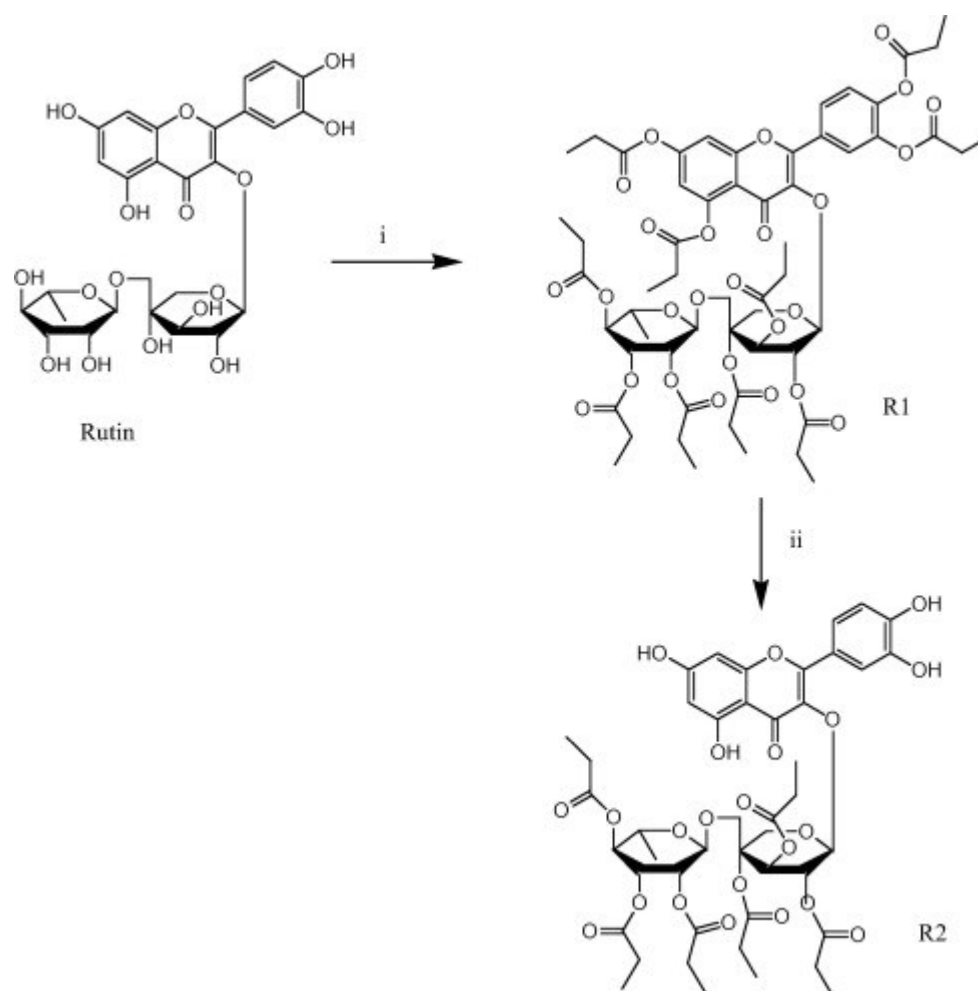
3.2.1 Rutin

Roku 1842 byl započat příběh rutinu, kdy jej ze zahradní rostliny Routu vonné (*Ruta graveolens*) izoloval August Weiss, německý chemik a lékárník z Norimberku.^{62,63}

Přírodní rutin (3',4',5,7-tetrahydroxyflavon-3-rutinosid) je jednou z nejvíce vyhledávaných fotochemikálií vůbec, jelikož má velmi dobré farmakologické účinky. Tyto účinky jsou důvodem, proč je považován za tak důležitý flavonolový glykosid v potravinářském a farmakologickém průmyslu. Velkou nevýhodou u rutinu však je jeho špatná biologická dostupnost, která je propojena s jeho malou rozpustností v tucích, právě tato vlastnost limituje praktické využití rutinu.⁶⁴

Rutin a jeho špatná rozpustnost v tucích dali podnět ke studii,⁶⁵ v rámci níž probíhala modifikace rutinu na jeho semisyntetický derivát, který by umožnil právě jeho lepší rozpustnost.

Esterifikace rutinu byla provedena na všech hydroxylových skupinách, a to za použití propionylchloridu v přítomnosti 4-dimethylaminopyridinu (i), rutin byl následně selektivně deacylován na fenolických hydroxylových skupinách za použití triethylaminu (ii) v methanolu (Obrázek 13).



Obrázek 13 Syntéza hexasubstituovaného derivátu rutinu.

4 MOŽNOSTI STANOVENÍ FLAVONOLOVÝCH GLYKOSIDŮ

Aby bylo možné v biologických materiálech glykosidy stanovit, musí být nejprve z daného materiálu extrahovány. Tradiční extrakční metody (kapitola 1.4.1) používané pro izolaci flavonoidů často způsobují problémy s neefektivitou, vysokou spotřebou energie či značnou spotřebou rozpouštědel a tak dále. Nové extrakční metody a technologie (kapitola 1.4.2) zaváděné do praxe v posledních letech umožnily mnohem efektivnější extrakci flavonoidů. Vzhledem k množství různých typů flavonoidů nemohou jednotlivé extrakční metody obecně splňovat všechny konkrétní požadavky, a proto je doporučováno aplikovat tradiční a moderní metody společně, a to na základě účelu samotné extrakce.^{30,36}

V současné době jsou instrumentální metody využívány pro účely kvalitativního stanovení i pro kvantitativní stanovení obsahu zkoumaných látek v určitém vzorku. Instrumentální analýza představuje postup, při kterém jsou pro chemickou analýzu využívány fyzikální, popřípadě i fyzikálně-chemické vlastnosti stanovovaných látek, a jejich roztoků. Tyto metody využívá například interakci sledovaných sloučenin se světlem i s dalšími typy záření. Využívány mohou být kupříkladu i elektrochemické vlastnosti látek či jejich chování v magnetickém poli. Podle typu interakce jsou instrumentální metody děleny na separační, optické a elektrochemické.^{66,67}

Pod pojmem separační metody je možné si představit využití k analýze směsí či stanovování čistoty a totožnosti zkoumané látky. Metody optické umožňují měření koncentrace, ale taktéž kontrolu totožnosti a čistoty. Elektrochemické metody jsou nejběžněji využívány pro měření koncentrací či taktéž pro kontrolu čistoty.⁶⁷

V současnosti již lze instrumentální metody automatizovat, díky čemuž je možné jejich využití při konkrétních analýzách v poměrně krátkém čase. Tohoto je hojně užíváno v situacích, kdy vzorky, u kterých je nutné provést rozbor, jsou nastřádány v obrovské množství, a je třeba je analyzovat s využitím téhož typu analýzy, v intervalech, popřípadě kontinuálně. Instrumentální metody pro stanovování látek jsou tak nyní využívány při výrobě nebo pro kontrole výroby potravin a surovin.^{67,68}

Pro instrumentální metody je běžný grafický či číselný výstup díky propojení s počítačem a chemickými srovnávacími databázemi v nich. Jednat se může nejčastěji o spektrofotometrii, atomovou absorpční spektrometrii, plynovou chromatografii nebo kapalinovou chromatografii. V současné době je možné analyzovat strukturu jakékoliv

látky, popřípadě zjišťovat složení směsi do stopových množství z velmi malých množství vzorků, často jen z několika málo miligramů.^{67,68}

V nynější éře jsou flavonolové glykosidy v rámci rostlinných vzorků analyzovány a vyhodnocovány hned několika typy instrumentálních metod. Nejčastěji se jedná o vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC; z angl. High-Performance Liquid Chromatography), ultrafialovo-viditelnou spektroskopii (UV-Vis; z angl. Ultraviolet-Visual Spectroscopy), infračervenou spektrometrii (IR; z angl. Infrared spectrometry).^{67,68}

4.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je technika, která byla vyvinuta z klasické sloupcové chromatografie a v dnešní době je jednou z nejčastěji používaných i uznávaných metod analytické chemie. Aktuálně je tato instrumentální metoda hlavním a nedílným analytickým nástrojem používaným v moderním farmaceutickém průmyslu, a to ve všech fázích vývoje a výroby léčiv.⁶⁹

HPLC je používána pro kontrolu čistoty nových chemických entit, sledování změn reakcí v syntetických postupech nebo škálování, vyhodnocování a provádění kontroly kvality i pro zajištění konečného léčivého produktu.⁷⁰

Cílem metody HPLC je stanovit, oddělit a kvantifikovat látku, na kterou je daná analýza vzorku zaměřena (stanovení vitamínů, dále také stanovení reakčních nečistot a oddělení jich od sebe). Má schopnost oddělit, identifikovat a kvantifikovat sloučeniny, které jsou přítomny v jakémkoli vzorku v kapalině. HPLC je vhodná především pro analýzu látek, které jsou tepelně nestabilní, netěkavé a polární.^{69,70}

Princip HPLC spočívá v tom, že roztok vzorku je vstříkovan do kolony porézního materiálu (stacionární fáze) a kapalná fáze (mobilní fáze) je čerpána při vyšším tlaku přes kolonu. Principem separace je adsorpce rozpuštěné látky na stacionární fázi na základě její afinity ke stacionární fázi.⁷¹

Metodu HPLC je v této práci důležité zmínit, jelikož flavonoidy rozebírané v této práci jsou aktuálně nejvíce separovány pomocí kapalinové chromatografie. Nejčastěji je využito kolon na reversní fázi, gradientové eluce, jež na počátku analýzy, která má na začátku hlavně vodnou fázi a dále dochází k postupnému nárůstu fáze organické. Detekce je pak prováděna za pomoci detektoru UV/Vis.⁷²

Z velké části bývá pro HPLC analýzu flavonoidů doporučována zvýšená teplota kolony (30–40 °C). Jako nejvíce využívané látky pro mobilní fázi jsou methanol, acetonitril a voda. Je obecně známo, že acetonitril poskytuje „ostřejší“ píky, avšak využití methanolu je stále častější, vzhledem k jeho netoxickému charakteru. Opomíjena by neměla být ani hodnota pH u probíhající separace. Vzhledem k případné ionizaci vzorků flavonoidů by pH nemělo překročit hodnotu 4,0 a za optimum je považováno rozmezí mezi 2–4, těchto hodnot pH je docíleno díky přidavku malého množství kyseliny k mobilní fázi. Využita může být například kyselina mravenčí, fosforečná nebo octová. Gradientový eluční systém je při identifikaci fenolických látek užíván častěji než systém isokratický. Flavonoidy jsou obvykle detekovány využitím detektoru UV/Vis, fluorescenčního detektoru nebo fotodiodového detektoru.⁷³

Jak již bylo zmíněno v kapitole 1.2.4 Rutin, tato látka má velmi významné farmakologické vlastnosti prospěšné pro lidské zdraví.²¹ Rutin lze nalézt v semenech, listech a květech pohanky,⁷⁴ dále také v rostlinných částech citrusů a jiných jedlých či nejedlých rostlinách. V nedávno publikované práci⁷⁵ se autoři zajímali o možnosti izolace a separace rutinu z listů banánovníku (*Musa Balbisiana*).

Studie si pro své zkoumání zvolila právě banánovník z důvodu jeho velkého nutričního významu. Pyšní se vysokým obsahem vitamínů, minerálů, flavonoidů a fenolických sloučenin.⁷⁶ Konkrétně z uvedeného druhu *Musa Balbisiana* je možné využít všechny jeho části. Vzhledem k faktu, že banánové listy jsou dostupné ve velkém množství, tak je možné jejich využití jako zdroj surovin pro průmysl tzv. zelených technologií. Vzhledem k neefektivnosti využití rutinu, kvůli jeho vysoké ceně, bylo cílem získat bohatý zdroj, který je velmi levný a hojně dostupný. Rutin byl detekován v surovém extraktu a frakcích listů právě *Musa paradisiaca*.⁷⁷

V první řadě bylo nutné provést extrakci vzorku, ke které bylo v této studii⁷⁵ užito 1,0 kg na vzduchu usušených a následně pomletých listů banánovníku. K rozdrcenému vzorku bylo dále přidáno 5 litrů 95 % ethanolu. Vzorek byl takto ponechán po dobu 5 dnů ve vsádkovém reaktoru při laboratorní teplotě (30 °C) za každodenního promíchání. Po uplynulé době byl extrakt zfiltrován za využití vakuové filtrace, z důvodu odstranění zbylého prachu. Následně se provedlo odpaření, díky čemuž se získalo 124 g surového extraktu (to činilo 12,4 % sušených listů banánovníku), samotný extrakt obsahoval 5,3 % rutinu. Kvantifikace obsahu rutinu v surovém extraktu byla provedena za pomoci standardní metody HPLC.⁷⁵

Chromatografická spektra HPLC surového extraktu se získaly z naředěného vzorku v rozmezí koncentrací 0,1–5,0 mg·l⁻¹. Ze surového extraktu byla koncentrace rutinu vypočítána pomocí kalibrační křivky získané se standardními roztoky rutinu v methanolu. Kladný lineární vztah mezi koncentrací rutinu a plochami píku byl sledován v rozmezí 0,8–80 mg·l⁻¹. Pík rutinu, rozpoznáný při vlnové délce 365 nm, byl detekován v čase 5,7 minuty. Výsledkem této HPLC analýzy byl obsah rutinu vyjádřený jako 52,9 ± 3,6 mg·g⁻¹ surového extraktu.⁷⁵

4.2 Ultrafialová-viditelná spektroskopie

Opět se jedná o analytickou techniku, jež měří množství vlnových délek UV či viditelného světla, které jsou absorbovány nebo prostupují vzorkem ve srovnání s referenčním nebo slepým vzorkem. Díky vzájemnému působení atomů a molekul s elektromagnetickým zářením dochází k přijetí množství energie jakožto fotonů s následným zvýšením energie atomu molekuly, a to ze stavu základního do stavu excitovaného.⁷⁸

Světlo disponuje určitým množstvím energie, které je nepřímo úměrné jeho vlnové délce. Kratší vlnové délky světla tedy nesou více energie a delší vlnové délky méně energie. K podpoře elektronů do vyššího energetického stavu, kterou lze detekovat jako absorpci, je zapotřebí určité množství energie. Elektrony v různých vazebných prostředích v látce vyžadují různé specifické množství energie, aby se dostaly do vyššího energetického stavu. To je důvod, proč dochází k absorpci světla pro různé vlnové délky u strukturně odlišných typů sloučenin.⁷⁹

Lidé jsou schopni vidět spektrum viditelného světla, od přibližně 380 nm, to se jeví jako fialové, do 780 nm, které se jeví jako červené. UV světlo má vlnové délky kratší než viditelné světlo, přibližně do 100 nm. Proto ho lze popsat jeho vlnovou délkou, což může být užitečné v rámci UV-VIS spektroskopie k analýze nebo identifikaci různých látek, lokalizací specifických vlnových délek odpovídajících maximální absorbanci.^{78,80}

Základní skelet flavonoidů je tvořen dvěma aromatickými kruhy (,A' a ,B') spojenými heterocyklickým motivem (,C'). V oblasti UV-Vis se flavonoidy vymezují dvěma hlavními absorpčními pásy: v rozsahu 320–385 nm, které ve spektru charakterizují kruh ,B' a v rozsahu 240–280 nm představující kruh ,A'. Konkrétně ve spektru rutinu jsou absorpční maxima při

257 nm a 355 nm, kvercetin vykazuje zóny s maximem při 255 nm a 368 nm a u kaempferolu je maximální absorpce dosažena při 265 nm a 365 nm.⁸¹

4.3 Infračervená spektrometrie

Infračervená spektrometrie (IR) je jedna z nejdéle využívaných spektrálních metod. Její největší výhodou je, že nejsou zapotřebí téměř žádné další chemikálie (vyjma KBr pro přípravu tablet, díky nimž dochází k menším ztrátám intenzity záření způsobené odrazem) stačí pouze přístroj a zkoumaný vzorek. Automatizované, opakované analýzy lze proto provádět s velmi nízkými náklady. Tyto výhodné faktory metody podnítily vývoj nové generace analytických IR spektrometrů, které kombinují vysokou rychlost snímání s vynikající spektrální citlivostí. Souběžně s novým hardwarem se objevily výkonné chemometrické algoritmy a softwarové balíčky a neustále se objevují nové aplikace.⁸²

Infračervená spektrometrie je typ techniky, která zahrnuje interakci infračerveného záření s hmotou. Je založena na absorpci, emisi nebo rozptylu infračerveného záření vzorkem a používá se k identifikaci a analýze chemické struktury vzorku. Výhodou této techniky je, že lze studovat jakýkoli vzorek prakticky v jakémkoli stavu. Snadno lze zkoumat například prášek, pastu, směs, plynové filmy a vlákna.⁸³

Princip infračervené spektrometrie je založen na vibracích atomů a dipólovém momentu sloučenin. Pokud infračervené záření prochází vzorkem, část dopadajícího záření o určité energii je absorbována vibrujícími atomy. Energie vibračních vazeb odpovídá energii absorpce. Tímto způsobem se získá infračervené spektrum. Infračervená emise je elektromagnetické záření, které leží mezi viditelnou a mikrovlnnou oblastí elektromagnetického záření. Mají delší vlnovou délku než UV záření a delší frekvence než viditelné světlo.⁸³

5 FLAVONOLY A JEJICH GLYKOSIDY JAKO BIOAKTIVNÍ LÁTKY

Flavonolové glykosidy jsou nejběžnější a nejrozšířenější skupinou rostlinných fenolických sloučenin, vyskytujících se prakticky ve všech částech rostlin, zejména v rostlinných buňkách fotosyntézy. Jsou hlavní barevnou složkou kvetoucích rostlin. Flavonolové glykosidy jsou nedílnou součástí lidské i zvířecí stravy. Jelikož se jedná o fytochemikálie, tak nemohou být syntetizovány lidmi ani zvířaty a je nutné je přijímat prostřednictvím potravy. Flavonolové glykosidy v potravinách jsou obecně zodpovědné za barvu, chuť, prevenci oxidace tuků a ochranu vitamínů a enzymů.^{84,85}

Ačkoli většina ovoce a některé luštěniny obsahují i tzv. katechiny, jejich množství se pohybuje pouze od 4 do 610 mg·kg⁻¹.⁸⁶

Příprava a zpracování potravin může snížit koncentraci flavonolových glykosidů v závislosti na použitých metodách. V nedávné studii⁸⁷ bylo kupříkladu zjištěno, že pomerančové džusy obsahují 81–200 mg·l⁻¹ rozpustných flavonolových glykosidů, zatímco jejich obsah v koncentrátu byl 206–644 mg·l⁻¹, což naznačuje, že glykosidy jsou v rámci zhuštěného roztoku koncentrovány během zpracování a skladování.⁸⁸

Přesný odhad průměrného dietárního příjmu flavonoidů je obtížný kvůli široké škále dostupných flavonoidů a rozsáhlé distribuci v různých rostlinách a také různorodé spotřebě u lidí.⁸⁹ V následujících odstavcích bude pozornost zaměřena na to, jakými biologickými účinky disponují tři flavonoly a jejich glykosidy, v této práci rozebírané:

5.1 Kvercetin

Kvercetin se řadí mezi jeden z neznámějších flavonoidů vůbec a je součástí lidské stravy již řadu let. Jeho příjem je spojován s množstvím zdravotních výhod, včetně antioxidačních, protizánětlivých, antivirových a protirakovinných, stejně jako se schopností zmírňovat příznaky některých kardiovaskulárních onemocnění (onemocnění srdce, hypertenze a vysoká hladina cholesterolu v krvi). Špatná rozpustnost ve vodě, chemická nestabilita a nízká biologická dostupnost kvercetinu však značně omezují jeho použití.⁹⁰

Natrávený kvercetin v lidském těle podléhá glukuronidaci (reakce k eliminaci cizorodých sloučenin), sulfataci (detoxikační proces, jehož výsledkem je ve vodě vysoce rozpustný produkt) nebo methylaci. Během zpracování a skladování potravin může

chemickou stabilitu (včetně oxidace a degradace) kvercetinů ovlivnit mnoho faktorů, jako je teplo či pH. Využití transportních systémů včetně nosičů na bázi lipidů, nanočástic, inkluzních komplexů, micel a zapouzdření na bázi konjugátů má potenciál zlepšit jak stabilitu, tak i biologickou dostupnost, a tím i zdravotní přínosy kvercetinů.⁹⁰

Kvercetin představuje dietní flavonoid, jak již bylo napsáno výše, bez sacharidu, který je hojně obsažen například v jablkách, aronii, červené cibuli, rajčatech, salátu či bobulích.⁹¹

Vzhledem k celosvětovému problému s velkým množstvím odpadu, pocházejícího nejen z potravinářského průmyslu, nastává krom mnoha zdravotních benefitů také možnost využití cirkulárního konceptu biohospodářství. Ovocné a zeleninové odpady, jakožto vedlejší produkty, mohou být levným zdrojem surovin, které lze dále využít k izolaci nejen bioaktivních látek.⁹²

Kromě toho se uvádí, že kvercetin má silný potenciál v léčbě rakoviny. Celosvětový odhad diagnostikované rakoviny v roce 2025 činí více než 2 miliony nových případů. Jak bylo zdokumentováno, kvercetin může inhibovat hojné množení, novotvoření či bujení (tzv. proliferaci) různých typů rakovinných buněk (např. kolorektálních rakovinných buněk, buněk rakoviny prostaty, buněk rakoviny jater, buněk rakoviny slinivky břišní a buněk rakoviny plic) tím, že moduluje jejich buněčné procesy a brání jim v růstu.⁹³

Vzhledem ke svým potenciálním zdravotním přínosům pro člověka se kvercetin dostal do středu zájmu využití jakožto nutriční složka v potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Stabilita kvercetinů byla rozsáhle studována za účelem zkoumání jeho chemických změn během zpracování i skladování potravin. Obsah kvercetinů nebo derivátů kvercetinů by mohl být dramaticky snížen v důsledku oxidace a degradace během zpracování a skladování potravin.⁹⁴



Obrázek 14 Možné účinky kvercetinů na lidské tělo.

Ve studii z roku 2018⁹⁵, která se zabývala izolací fotochemikálií z jírovce indického (*Aesculus indica*), byly v čistém stavu izolovány dva antioxidanty, přičemž jedním z nich byl právě kvercetin. Koncentrace tohoto flavonolu činila v surovém extraktu $85,3 \pm 1,2 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$. Závěrem této studie bylo, že plody rostliny mohou být efektivně využívány k minimalizaci oxidačního stresu, který způsobují ROS.⁹⁵

Procento potenciálu vychytávání volných radikálů mělo pro kvercetin hodnotou $\text{IC}_{50} = 78 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (koncentrace, při níž je zachyceno 50 % roztoku volných radikálů).

5.2 Kaempferol

Kaempferol se opět řadí mezi přírodní flavonoly a nejčastěji se vyskytuje v různých rostlinách a potravinách rostlinného původu, včetně hroznů, kapusty, fazolí, brokolice, rajčat, špenátu, čaje a v listech Jinanu dvoulaločného.⁹⁶

Několik prací^{97–100} uvádí pozitivní účinky dietního kaempferolu při snižování rizika chronických onemocnění, jako je rakovina, poškození jater, obezita a diabetes. Taktéž vykazuje protizánětlivé vlastnosti a používá se k léčbě mnoha akutních a chronických onemocnění vyvolaných zánětem, jako je degenerace meziobratlových plotének a kolitida, postmenopauzální úbytek kostní hmoty či akutní poškození plic.^{101,102}

Nicméně je doposud málo známo o buněčných a molekulárních mechanismech, které jsou základem působení kaempferolu v centrálním nervovém systému. Také vztah mezi strukturálními vlastnostmi kaempferolu a jejich glykosylací a biologickými přínosy těchto sloučenin je nejasný. Tato látka je zkoumána při léčbě Alzheimerovy choroby,¹⁰³ Parkinsonovy choroby,¹⁰⁴ ischemické mrtvice,¹⁰⁵ epilepsie,¹⁰⁶ depresivních poruch,¹⁰⁴ úzkostných poruch,¹⁰⁴ neuropatických bolestí nebo glioblastomů.¹⁰⁷

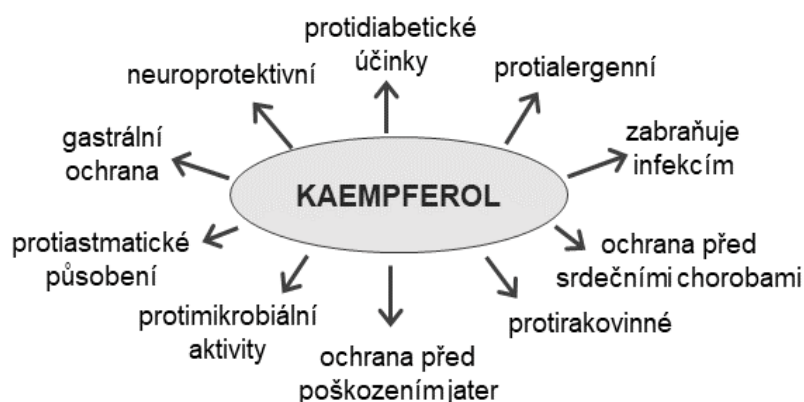
Co se dalších benefitů týče, kaempferol disponuje silnými antioxidačními, protizánětlivými, antimikrobiálními, kardiovaskulárními a neuroprotektivními vlastnostmi. Díky své podobnosti s estrogenem lze kaempferol použít k léčbě hormonálně regulovaných karcinomů, jako je karcinom vaječnicků, prsu, děložního čípku, hepatocelulární karcinom a leukémie. Kaempferol vykazuje mírnou cytostatickou aktivitu proti buněčným liniím lidských rakovinných buněk (např. PC3 – lidské rakovinné buňky prostaty, HeLa – lidské epitelové buňky). Kaempferol také zvyšuje pravděpodobnost četnosti buněčné smrti zvanou apoptóza v buňkách rakoviny vaječnicků prostřednictvím stimulace proteinu p53 ve vnitřní dráze.¹⁰⁸

Bioaktivita nejen kaempferolu, ale i kvercetinů v lidském těle závisí na jejich biologické dostupnosti vůči tělesným tkáním. Biologická dostupnost sloučeniny se týká úrovně trávení, vstřebávání a metabolismu po požití potravy, což je potenciální krok k hodnocení mechanismu účinku sloučeniny.^{109–111}

Jisté farmaceutické studie realizované na kaempferolu ukazují, že je biologicky dostupnější ve formě konjugované nežli ve volné formě. Nedávná literatura¹¹² dochází k závěru, že se kaempferol rychle metabolizuje v játrech. Z jater cirkuluje ve formě sulfátů a glukuronidů do celého těla. Bioaktivita může být hodnocena měřením těchto konjugátů v krvi a moči člověka.^{113,114}

Před nedávnem byla tato látka označena americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA; z angl. Food and Drug Administration) za všeobecně bezpečnou látku (GRAS; z angl. Generally Recognized as Safe) podporující zdraví v mnoha ohledech.¹¹⁵

Mechanismus antimikrobiálního působení této fytochemikálie byl široce zkoumán za účelem jejího efektivního použití při vývoji nových léčiv. Farmaceutická studie¹¹⁶ ukazuje, že kaempferol je potenciálně antimikrobiální látkou, která dokáže inhibovat různé patogenní mikroorganismy. Studie o mikrobiálních účincích kaempferolu poskytují zajímavé poznatky. Konkrétně bylo prokázáno, že ničí aktivitu patogenu (*Staphylococcus aureus*) a brání ukotvení jeho povrchových proteinů, které snižují adhezi fibrinogenu, který podporuje tvorbu biofilmu.¹¹⁷



Obrázek 15 Možné účinky kaempferolu na lidské tělo.

V nalezené studii¹¹⁸ zaměřené na antidiabetickou aktivitu plodu okurky seté (*Cucumis sativus*) byla aktivní látka izolovaná za pomoci sloupcové chromatografie. Kolona byla izokraticky eluována směsí chloroform:ethylacetát (6:4) a vzniklo 22 frakcí. Eluáty

(22 frakcí) byly rozděleny do tří frakcí A (frakce 1–12), B (frakce 13–19) a C (frakce 20–22). Frakce B, která byla identifikovaná za využití metody HPLC jako kaempferol, byla aktivní při redukci zvýšené hladiny glukózy v krvi u krys s cukrovkou, která byla uměle vyvolaná alloxanem. Kaempferol taktéž inhiboval aktivity α -amylázy a α -glukosidázy. Tento fakt poukazuje na to, že kaempferol může svou aktivitou způsobovat snížení hladiny glukózy konzumací plodů okurky seté prostřednictvím inhibice α -amylázy a α -glukosidázy.¹¹⁸

5.3 Myricetin

Myricetin představuje běžný flavonoid rostlinného původu, který je známý pro svou značnou nutriční hodnotu. Je jednou z klíčových složek různých potravin a nápojů. Sloučenina se prezentuje obsáhlou škálou biologických účinků, např. antioxidačních, protirakovinných, antidiabetických a protizánětlivých. Vykazuje také aktivity, které souvisejí s centrálním nervovým systémem a rozsáhlé studie naznačují, že sloučenina může být prospěšná jakožto ochrana před nemocemi, jimiž jsou Parkinsonova a Alzheimerova choroba.¹¹⁹

Využití myricetinu jakožto konzervačního činidla k prodloužení trvanlivosti potravin obsahujících tuky a oleje se připisuje schopnosti sloučeniny chránit lipidy před oxidací.¹¹⁹

Několik studií^{120,121} prokázalo biologickou aktivitu této látky proti řadě polymeráz deoxyribonukleových kyselin (DNA; z angl. deoxyribonucleic acid) a polymeráz ribonukleových kyselin (RNA; z angl. ribonucleic acid), reverzních transkriptáz, telomeráz, kináz či helikáz. Myricetin vykazoval účinky proti stárnutí pokožky tím, že ničil příčinné volné radikály v kůži.^{119,122}

Četný výzkum protirakovinných aktivit myricetinu ukázal, že sloučenina je cytotoxická vůči řadě lidských rakovinných buněčných linií, včetně buněk rakoviny jater, kůže, slinivky a tlustého střeva. Inhibuje také klíčové enzymy podílející se na iniciaci a progresi rakoviny. Studie mechanismu účinku odhalila, že dvojná vazba mezi C2–C3, aromatický kruh ,B' na C-2 a hydroxyskupiny v kruhu ,B' jsou nejspíš zodpovědné za cytotoxicitu. Sloučenina vykazovala cytotoxicitu vůči buňkám chronické myeloidní lidské leukémie.¹²³

Antihypertenzní působení myricetinu bylo prokázáno *in vivo* podmínkách. Hypertenze a oxidační stres byly sníženy po léčbě perorálními dávkami 100 a 300 mg

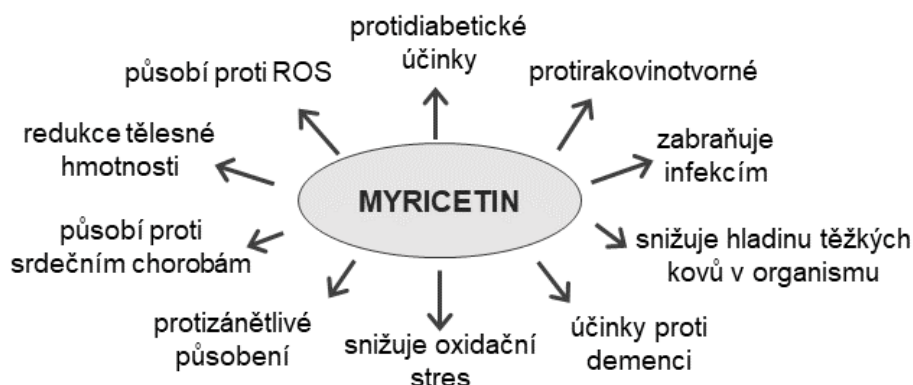
myricetinu·kg⁻¹ tělesné hmotnosti u potkanů. Bylo evidentní snížení systolického krevního tlaku i změny vaskulární reaktivity.¹²⁴

Protizánětlivé účinky jsou úzce spjaty s antioxidačním působením, protože jednou z hlavních odezev zánětu je oxidační stres. V jedné studii¹²⁵ byl hodnocen protizánětlivý účinek myricetinu na akutních i chronických modelech zánětu, a byla zjištěna významná inhibice xylenem indukovaného otoku ucha a karagenanem indukovaného otoku zadní končetiny. V modelu edému zadní končetiny vyvolaného karagenanem vedla léčba myricetinem k významnému snížení příznaků zánětu a současnému snížení počtu leukocytů. Myricetin byl také účinný v prevenci chronického zánětu, který inhiboval tvorbu granulační tkáně. Celkově vzato, myricetin vykazoval silnou protizánětlivou aktivitu pro akutní i chronický zánět,¹²⁶ což může být spojeno s jeho antioxidační aktivitou.¹²⁵

Zamora-Ros a kolegové (2014) prostřednictvím statistické analýzy uvedli výzkumný vztah mezi příjmem flavonoidů v potravě a diabetem typu II v rámci evropské populace. Mezi různými flavonoidy vykazoval myricetin inverzní souvislost s rizikem diabetu typu II, což naznačuje, že myricetin má potenciální antidiabetickou aktivitu.¹²⁷

Diabetes je metabolická porucha vedoucí k hyperglykémii a rozvoji komplikací specifických pro diabetes, jako jsou makrovaskulární a mikrovaskulární onemocnění. Diabetes úzce souvisí se zánětem a oxidačním stresem. Chronické zánětlivé reakce, včetně produkce cytokinů, mají za následek dysfunkci inzulínu a β -buněk, a nakonec výskyt diabetu. Myricetin a jeho antioxidační i protizánětlivé účinky mohou v důsledku toho být užitečnými při prevenci diabetických komplikací.¹²⁸

Myricetin taktéž u laboratorních zvířat prokázal účinky proti obezitě, jež byla vyvolána nevhodným stravováním. V tomto případě bylo podávání myricetinu pravděpodobně nápomocné ke snížení tělesné hmotnosti, dále hmotnost viscerálního tukového polštáře a hladiny lipidů v plazmě, ale také snížil hladinu triglyceridů a cholesterolu.¹²⁹



Obrázek 16 Možné účinky myricetinu na lidské tělo.

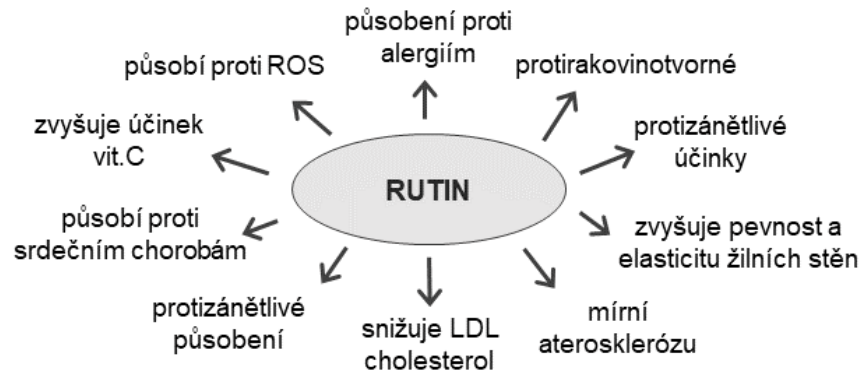
5.4 Rutin

Rutin je flavonolovým glykosidem, o kterém se uvádí, že má klinicky relevantní funkce, potenciálně prospěšné při prevenci nemocí a ochraně stability genomu. Databáze dietních doplňků uvádí více než 860 produktů obsahujících rutin, které jsou v současné době prodávány na území Evropské unie. Léky s obsahem rutinu (např. Ascorutin, který patří mezi venofarmaka) jsou speciálně doporučovány k léčbě různých chorobných stavů, jako jsou křečové žíly, vnitřní krvácení nebo hemoroidy. Běžné perorální dávky rutinu se pohybují od 60 mg do 100 mg denně, pro populaci dospělých osob a lze v nich bezpečně pokračovat po dlouhou dobu, až 6 měsíců. K dnešnímu dni se uvádí, že více než 70 druhů rostlin obsahuje rutin.¹³⁰

Hlavní nevýhodou rutinu je jeho špatná biologická dostupnost, způsobená především jeho špatnou rozpustností ve vodě, nízkou stabilitou a omezenou membránovou permeabilitou. To jsou hlavní faktory, které brání výzkumům biologických účinků rutinu, přestože se jedná o látku, která může vykazovat detekovatelnou biologickou aktivitu v různých systémech. Navíc nízká rozpustnost rutinu v tucích omezuje jeho praktické použití pro topické aplikace. Vzhledem k tomu, že poptávka po přírodním rutinu má rostoucí trend, je důležité přezkoumat nejnovější metody extrakce a čištění tohoto flavonoidu. Kromě toho bylo v poslední době věnováno značné výzkumné úsilí výrobě specifitějších a účinnějších derivátů flavonoidů s minimálními vedlejšími účinky, vysokou biologickou dostupností a terapeutickým přínosem pro použití v potravinářském a farmaceutickém průmyslu.¹³¹

Rutin prokázal širokou škálu farmakologických aplikací díky svým významným antioxidačním vlastnostem. Běžně se rutin používá jako antimikrobiální, antifungální

a antialergické činidlo. Současný výzkum prokázal jeho farmakologické přínosy pro léčbu různých chronických onemocnění, jako je rakovina, diabetes, hypertenze a hypercholesterolemie.¹³²



Obrázek 17 Možné účinky rutinu na lidské tělo.

6 VÝHLED DO BUDOUCNA

Sloučeniny, kterým je věnována tato bakalářská práce (kvercetin, kaempferol, myricetin, rutin) a jejich biologická aktivita jsou současnými studii relativně dobře popsány. Jak bylo možné vidět, jsou již v současné době využívány k celé řadě různých léčebných účelů. Navíc jsou nadále zkoumány a je zjišťováno, zda nemohou působit i na další případná onemocnění. Slibný potenciál je vykazován také v případech rakovinového bujení, které je v posledních letech stále častější.

Tyto přírodní produkty jsou stavebním kamenem pro větší rozvoj léků, díky jejich snadné dostupnosti a nízkému počtu nežádoucích účinků. Avšak, dle mého názoru, by bylo vhodné v následujících letech zaměřit pozornost směrem k racionální syntéze jejich derivátů s cílem zlepšit jejich farmakodynamické a farmakokinetické vlastnosti. Pochopení složitých biochemických a farmakokinetických drah, u nichž se předpokládá, že budou ovlivněny flavonoidy, by jistě připravilo cestu pro jejich vývoj jako budoucích antivirových léčiv

ZÁVĚR

Cílem předložené bakalářské práce s názvem „Flavonolové glykosidy“ bylo přiblížit rostlinné látky zvané flavonolové glykosidy, za účelem zvýšení povědomí o jejich velkých zdravotních benefitech. Glykosidy představují rostlinné stavební látky, které vznikají vazbou cukerné složky (například glukózy) na necukernou látku aglykon, který je hlavním nositelem účinku glykosidů. Glykosidy jsou rozložitelné kyselinami a některými enzymy, některé mohou být toxické.

Pozornost byla věnována hlavním třem nejznámějším flavonolům (kvercetin, kaempferol, miricetin) a některým jejich glykosidům (rutin). Tyto látky jsou už po několik dekád intenzivně zkoumány, a to zejména pro jejich četné biologické účinky.

Jedná se o látky, které se vyskytují pouze v rámci rostlin a živočišné tělo je není schopno vytvářet. Jelikož se vyskytují i v nutričně významných zdrojích potravy, jako je ovoce, zelenina nebo obiloviny, není zvláštní, že odborníci doporučují jejich konzumaci. Avšak lidé mají stále větší problémy dodržovat zdravou životosprávu, a je poměrně náročné tyto látky z rostlin extrahovat a izolovat, pak jsou syntetizovány i umělou cestou. V podobě potravinových doplňků jsou též stále v narůstajícím množství prodávány na farmaceutickém trhu.

Společnou charakteristikou všech flavonolů a jejich glykosidů je, že jsou vysoce biologicky aktivní. Jedná se především o jejich intenzivní oxidační účinky. Volné radikály se vyskytují v lidských tělech, kde porušují buňky, popřípadě způsobují i jejich úplnou smrt. Glykosidy jsou schopné množství radikálů snižovat nebo je zcela ničit. Mimo silné oxidační účinky jsou všechny zmíněné glykosidy charakteristické protizánětlivými a antimikrobiálními účinky. Velice intenzivně jsou navíc glykosidy zkoumány i pro jejich protinádorové účinky, kdy bylo již několika studiemi prokázáno, že jsou tyto molekuly schopné efektivně působit proti proliferaci rakovinných buněk.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Jan Velíšek. Chemie potravin. in *Chemie potravin, 3. díl* vol. 368 19–32 (OSSIS, 1999).
2. Panche, A. N., Diwan, A. D. & Chandra, S. R. Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science* vol. 5 Preprint at <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41> (2016).
3. Nabavi, S. M. *et al.* Flavonoid biosynthetic pathways in plants: Versatile targets for metabolic engineering. *Biotechnology Advances* vol. 38 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.005> (2020).
4. Herrmann, K. M. The Shikimate Pathway: Early Steps in the Biosynthesis of Aromatic Compounds. *Plant Cell* 907–919 (1995) doi:10.1105/tpc.7.7.907.
5. Staunton, J. & Weissman, K. J. Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Nat Prod Rep* **18**, 380–416 (2001).
6. Donald Voet, Judith G. Voet & Charlotte W. Pratt. *Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level*. (2013).
7. Dewick, P. M. *Medicinal natural products : a biosynthetic approach*. (2009).
8. Dwivedi, M. K., Sonter, S., Mishra, S., Patel, D. K. & Singh, P. K. Antioxidant, antibacterial activity, and phytochemical characterization of *Carica papaya* flowers. *Beni Suef Univ J Basic Appl Sci* **9**, (2020).
9. Jones, P. & Vogt, T. Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: Tranquilizers and stimulant controllers. *Planta* **213**, 164–174 (2001).
10. Pandey, R. P. *et al.* Glucosylation of Isoflavonoids in Engineered *Escherichia coli*. *Mol Cells* **37**, 172–177 (2014).
11. Bartnik, M. & Facey, P. C. Glycosides. *Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategy* 101–161 (2017) doi:10.1016/B978-0-12-802104-0.00008-1.
12. Gregory S. Kelly. Quercetin - Document - Gale Academic OneFile. <https://go.gale.com/ps/i.do?id=GALE%7CA259077887&sid=googleScholar&v=2.1&it=r&linkaccess=abs&issn=10895159&p=AONE&sw=w&userGroupName=anon%7E9f794c5> (2011).

13. Zhang, M. *et al.* Antioxidant Properties of Quercetin. in 283–289 (2011). doi:10.1007/978-1-4419-7756-4_38.
14. Du, Y., Wei, G. & Linhardt, R. J. Total Synthesis of Quercetin 3-Sophorotrioside. *J Org Chem* **69**, 2206–2209 (2004).
15. World Health Organization. & International Agency for Research on Cancer. *1,3-Butadiene, ethylene oxide and vinyl halides (vinyl fluoride, vinyl chloride and vinyl bromide)*. (International Agency for Research on Cancer Press, 2008).
16. Tang, S. M. *et al.* Pharmacological basis and new insights of quercetin action in respect to its anti-cancer effects. *Biomedicine and Pharmacotherapy* vol. 121 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109604> (2020).
17. Ren, J. *et al.* Recent progress regarding kaempferol for the treatment of various diseases (Review). *Exp Ther Med* (2019) doi:10.3892/etm.2019.7886.
18. Yao, Y. *et al.* Preformulation studies of myricetin: A natural antioxidant flavonoid. *Pharmazie* **69**, 19–26 (2014).
19. Ross, J. A. & Kasum, C. M. D *<sc>IETARY</sc> F <sc>LAVONOIDS</sc> : Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety. *Annu Rev Nutr* **22**, 19–34 (2002).*
20. Semwal, D. K., Semwal, R. B., Combrinck, S. & Viljoen, A. Myricetin: A dietary molecule with diverse biological activities. *Nutrients* vol. 8 Preprint at <https://doi.org/10.3390/nu8020090> (2016).
21. Frutos, M. J., Rincón-Frutos, L. & Valero-Cases, E. Rutin. *Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements* 111–117 (2019) doi:10.1016/B978-0-12-812491-8.00015-1.
22. Javed, H. *et al.* Rutin prevents cognitive impairments by ameliorating oxidative stress and neuroinflammation in rat model of sporadic dementia of Alzheimer type. *Neuroscience* **210**, 340–352 (2012).
23. Ostrakhovitch, E. A. & Afanas'ev, I. B. Oxidative stress in rheumatoid arthritis leukocytes: suppression by rutin and other antioxidants and chelators 1
1Abbreviations: CL, chemiluminescence; DF, desferrioxamine; DHR, dihydrorhodamine; FA, Fanconi anemia; HBSS, Hanks' balanced salt solution; NMMA, NG-monomethyl l-arginine; NO, nitric oxide; PMA, 12-O-myristate 13-

- acetate; PMN, polymorphonuclear; RA, rheumatoid arthritis, and SOD, superoxide dismutase. *Biochem Pharmacol* **62**, 743–746 (2001).
24. Liu, J., Wang, X., Yong, H., Kan, J. & Jin, C. Recent advances in flavonoid-grafted polysaccharides: Synthesis, structural characterization, bioactivities and potential applications. *Int J Biol Macromol* **116**, 1011–1025 (2018).
 25. Arts, I. C. W., Van De Putte, B. & Hollman, P. C. H. Catechin Contents of Foods Commonly Consumed in The Netherlands. 2. Tea, Wine, Fruit Juices, and Chocolate Milk. (2000) doi:10.1021/jf000026.
 26. Kumar, S. & Pandey, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. *The Scientific World Journal* vol. 2013 Preprint at <https://doi.org/10.1155/2013/162750> (2013).
 27. Chua, L. S. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. *J Ethnopharmacol* **150**, 805–817 (2013).
 28. Saito, K. *et al.* The flavonoid biosynthetic pathway in Arabidopsis: Structural and genetic diversity. *Plant Physiology and Biochemistry* vol. 72 21–34 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.02.001> (2013).
 29. Ferreira, O. & Pinho, S. P. Solubility of Flavonoids in Pure Solvents. *Ind Eng Chem Res* **51**, 6586–6590 (2012).
 30. Rodríguez De Luna, S. L., Ramírez-Garza, R. E. & Serna Saldívar, S. O. Environmentally Friendly Methods for Flavonoid Extraction from Plant Material: Impact of Their Operating Conditions on Yield and Antioxidant Properties. *Scientific World Journal* vol. 2020 Preprint at <https://doi.org/10.1155/2020/6792069> (2020).
 31. Yang, M. Efficient Extraction of Bioactive Flavonoids from Ginkgo biloba Leaves Using Deep Eutectic Solvent/Water Mixture as Green Media. *Chem Biochem Eng Q* **32**, 315–324 (2018).
 32. Feng, W., Hao, Z. & Li, M. Isolation and Structure Identification of Flavonoids. in *Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health* (InTech, 2017). doi:10.5772/67810.

33. Yan, L.-G., Deng, Y., Ju, T., Wu, K. & Xi, J. Continuous high voltage electrical discharge extraction of flavonoids from peanut shells based on “annular gap type” treatment chamber. *Food Chem* **256**, 350–357 (2018).
34. Oreopoulou, A., Tsimogiannis, D. & Oreopoulou, V. Extraction of Polyphenols From Aromatic and Medicinal Plants: An Overview of the Methods and the Effect of Extraction Parameters. in *Polyphenols in Plants* 243–259 (Elsevier, 2019). doi:10.1016/B978-0-12-813768-0.00025-6.
35. Rai, S. K., Apoorva, Rai, K. K. & Pandey-Rai, S. New perspectives of the *Artemisia annua* bioactive compounds as an affordable cure in treatment of malaria and cancer. in *Natural Bioactive Compounds* 299–315 (Elsevier, 2021). doi:10.1016/B978-0-12-820655-3.00015-X.
36. Briones-Labarca, V., Giovagnoli-Vicuña, C. & Cañas-Sarazúa, R. Optimization of extraction yield, flavonoids and lycopene from tomato pulp by high hydrostatic pressure-assisted extraction. *Food Chem* **278**, 751–759 (2019).
37. Ferreres, F. *et al.* Optimization of the recovery of high-value compounds from pitaya fruit by-products using microwave-assisted extraction. *Food Chem* **230**, 463–474 (2017).
38. SERDAR, G., DEMİR, E. & SÖKMEN, M. Sequential Green Extraction of Caffeine and Catechins from Green Tea. *International Journal of Secondary Metabolite* **6**, 283–291 (2019).
39. Yammine, S. *et al.* Extraction and purification of high added value compounds from by-products of the winemaking chain using alternative/nonconventional processes/technologies. *Crit Rev Food Sci Nutr* **58**, 1375–1390 (2018).
40. Chemat, F. *et al.* Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrason Sonochem* **34**, 540–560 (2017).
41. Jiří Dalecký. Ultrazvuková extrakce z rostlin. *Pragolab s.r.o. Publikační systém WebGet* <https://www.pragolab.cz/ultrazvukova-extrakce-z-rostlin> (2020).

42. Nadar, S. S., Rao, P. & Rathod, V. K. Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: A review. *Food Research International* **108**, 309–330 (2018).
43. Gligor, O. *et al.* Enzyme-assisted extractions of polyphenols – A comprehensive review. *Trends Food Sci Technol* **88**, 302–315 (2019).
44. Wang, L., Wu, Y., Liu, Y. & Wu, Z. Complex Enzyme-Assisted Extraction Releases Antioxidative Phenolic Compositions from Guava Leaves. *Molecules* **22**, 1648 (2017).
45. Raks, V., Al-Suod, H. & Buszewski, B. Isolation, Separation, and Preconcentration of Biologically Active Compounds from Plant Matrices by Extraction Techniques. *Chromatographia* vol. 81 189–202 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s10337-017-3405-0> (2018).
46. Verschoyle, R. D. *et al.* Preliminary safety evaluation of the putative cancer chemopreventive agent tricetin, a naturally occurring flavone. *Cancer Chemother Pharmacol* **57**, 1–6 (2006).
47. Nicolaou, K. C. & E. J. Sorensen. *Classics in Total Synthesis: Targets, Strategies, Methods*. (John Wiley & Sons, 1996).
48. Nicolaou, K. C., Vourloumis, D., Winssinger, N. & Baran, P. S. The Art and Science of Total Synthesis at the Dawn of the Twenty-First Century. *Angewandte Chemie International Edition* **39**, 44–122 (2000).
49. Springob, K. & Kutchan, T. M. Introduction to the Different Classes of Natural Products. in *Plant-derived Natural Products* 3–50 (Springer US, 2009). doi:10.1007/978-0-387-85498-4_1.
50. Nicolaou, K. C., Rigol, S. & Yu, R. Total Synthesis Endeavors and Their Contributions to Science and Society: A Personal Account. *CCS Chemistry* 3–37 (2019) doi:10.31635/ccschem.019.20190006.
51. QuercetinC₁₅H₁₀O₇-PubChem. (1962).
52. Vetrova, E. *et al.* A simple way for the preparation of natural antioxidant quercetin from rutin by subcritical water. *J Nat Sci Biol Med* **8**, 213 (2017).

53. Duan, Y., Sun, N., Xue, M., Wang, X. & Yang, H. Synthesis of regioselectively acylated quercetin analogues with improved antiplatelet activity. *Mol Med Rep* **16**, 9735–9740 (2017).
54. Rajesh R, U. & Dhanaraj, S. A critical review on quercetin bioflavonoid and its derivatives: Scope, synthesis, and biological applications with future prospects. *Arabian Journal of Chemistry* **16**, 104881 (2023).
55. Vermes, B., Farkas, L., Nógrádi, M., Wagner, H. & Dirscherl, R. The synthesis of afzelin, paeonoside and kaempferol 3-O- β -rutinoside. *Phytochemistry* **15**, 1320–1321 (1976).
56. JURD, L. The Selective Alkylation of Polyphenols. II. Methylation of 7-, 4'-, and 3'-Hydroxyl Groups in Flavonols. *J Org Chem* **27**, 1294–1297 (1962).
57. Lee, J. Y. *et al.* Design and Synthesis of Novel Antidiabetic Agents. *Arch Pharm Res* vol. 28 <http://apr.psk.or.kr> (2005).
58. Lee, Y.-J. & Wu, T.-D. Total Synthesis of Kaempferol and Methylated Kaempferol Derivatives. *Journal of the Chinese Chemical Society* **48**, 201–206 (2001).
59. Visweswaxa Rao A, B. K. *NUCLEAR OXIDATION IN THE FLAVONE SERIES*.
60. Dean, H. F. & Nierenstein, M. ATTEMPTS TO SYNTHESIZE MYRICETIN. *J Am Chem Soc* **47**, 1676–1684 (1925).
61. Kalff, J. & Robinson, R. XXVIII.—A synthesis of myricetin and of a galangin monomethyl ether occurring in galanga root. *J. Chem. Soc., Trans.* **127**, 181–184 (1925).
62. Couch, J. F. *Rutin, a New Drug From Buckwheat*.
63. Ahmad, M. *et al.* Development of a new rutin nanoemulsion and its application on prostate carcinoma PC3 cell line. *EXCLI J* **16**, 810–823 (2017).
64. Miyake, K. *et al.* Improvement of Solubility and Oral Bioavailability of Rutin by Complexation with 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Pharm Dev Technol* **5**, 399–407 (2000).
65. Baldisserotto, A. *et al.* Design, synthesis and biological activity of a novel Rutin analogue with improved lipid soluble properties. *Bioorg Med Chem* **23**, 264–271 (2015).

-
66. Li, X. *et al.* Comparative Analysis of Flavonoids and Polar Metabolite Profiling of Tanno-Original and Tanno-High Rutin Buckwheat. *J Agric Food Chem* **62**, 2701–2708 (2014).
 67. Pavel Klouda. *Moderní analytické metody*. vol. 2 (2003).
 68. Górska, A. Special Issue on Application of Instrumental Methods for Food and Food By-Products Analysis. *Applied Sciences* **12**, 3888 (2022).
 69. Kumar Bhardwaj, S. *A Review: HPLC Method Development and Validation*. <http://www.urpjournals.com> (2015).
 70. Satinder Ahuja & Henrik Rasmussen. *HPLC Method Development for Pharmaceuticals*. vol. 8 (LLC Raritan, 2007).
 71. Vidushi, Y., Meenakshi, B. & Bharkatiya, M. B. A REVIEW ON HPLC METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION. (2017) doi:10.26479/2017.0206.12.
 72. Stalikas, C. D. Phenolic Acids and Flavonoids: Occurrence and Analytical Methods. in 65–90 (2010). doi:10.1007/978-1-60327-029-8_5.
 73. de Rijke, E. *et al.* Analytical separation and detection methods for flavonoids. *J Chromatogr A* **1112**, 31–63 (2006).
 74. Hussain student, J. *et al.* Qualitative and quantitative comparison of rutin, quercetin and gallic acid concentrations in Syrian Capparis spinosa. L Leaves. ~ 407 ~ *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* **6**, 407–415 (2017).
 75. Yingyuen, P., Sukrong, S. & Phisalaphong, M. Isolation, separation and purification of rutin from Banana leaves (*Musa balbisiana*). *Ind Crops Prod* **149**, 112307 (2020).
 76. Zafar, M. & Akter, S. *Musa paradisiaca* L. and *Musa sapientum* L. : A Phytochemical and Pharmacological Review. *J Appl Pharm Sci* **2011**, 14–20.
 77. Padam, B. S., Tin, H. S., Chye, F. Y. & Abdullah, M. I. Banana by-products: an under-utilized renewable food biomass with great potential. *J Food Sci Technol* **51**, 3527–3545 (2014).
 78. Picollo, M., Aceto, M. & Vitorino, T. UV-Vis spectroscopy. *Physical Sciences Reviews* **4**, (2019).

79. Y. Safaei-Naeini, M. Aminzare, F. Golestani-Fard, F. Khorasanizadeh & E. Salahi. SUSPENSION STABILITY OF TITANIA NANOPARTICLES STUDIED BY UV-VIS SPECTROSCOPY METHOD. *Iranian Journal of Materials Science and Engineering* **9**, 62–68 (2012).
80. Baka, N. A., Abu-Siada, A., Islam, S. & El-Naggar, M. F. A new technique to measure interfacial tension of transformer oil using UV-Vis spectroscopy. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation* **22**, 1275–1282 (2015).
81. Liu, X.-G., Wu, S.-Q., Li, P. & Yang, H. Advancement in the chemical analysis and quality control of flavonoid in Ginkgo biloba. *J Pharm Biomed Anal* **113**, 212–225 (2015).
82. Beć, K. B., Grabska, J. & Huck, C. W. Near-Infrared Spectroscopy in Bio-Applications. *Molecules* **25**, 2948 (2020).
83. Beć, K. B., Grabska, J. & Huck, C. W. In silico NIR spectroscopy – A review. Molecular fingerprint, interpretation of calibration models, understanding of matrix effects and instrumental difference. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **279**, 121438 (2022).
84. Pattasseril, M. B. & Abraham, S. PHARMACEUTICAL SCIENCES ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF QUERCETIN IN MATHUKA NERIIFOLIA (MOON) H.J. LAM. ETHANOL EXTRACT QR code. *Lam. Ethanol extract., Indo Am. J. P. Sci* **2022**, 8 (2021).
85. Lesjak, M. & K. S. Srail, S. Role of Dietary Flavonoids in Iron Homeostasis. *Pharmaceuticals* **12**, 119 (2019).
86. Shomali, A. *et al.* Diverse Physiological Roles of Flavonoids in Plant Environmental Stress Responses and Tolerance. *Plants* **11**, 3158 (2022).
87. Amer, A. BIOTECHNOLOGY APPROACHES FOR IN VITRO PRODUCTION OF FLAVONOIDS. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences* **7**, 457–468 (2018).
88. Ciumărnean, L. *et al.* The Effects of Flavonoids in Cardiovascular Diseases. *Molecules* **25**, 4320 (2020).

89. Stewart, A. J. *et al.* Occurrence of Flavonols in Tomatoes and Tomato-Based Products. *J Agric Food Chem* **48**, 2663–2669 (2020).
90. Wang, W. *et al.* The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. *Trends Food Sci Technol* **56**, 21–38 (2016).
91. Jullian, C., Moyano, L., Yañez, C. & Olea-Azar, C. Complexation of quercetin with three kinds of cyclodextrins: An antioxidant study. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **67**, 230–234 (2007).
92. Bhat, I. U. H. & Bhat, R. Quercetin: A Bioactive Compound Imparting Cardiovascular and Neuroprotective Benefits: Scope for Exploring Fresh Produce, Their Wastes, and By-Products. *Biology (Basel)* **10**, 586 (2021).
93. Lotfi, N. *et al.* The potential anti-cancer effects of quercetin on blood, prostate and lung cancers: An update. *Front Immunol* **14**, (2023).
94. Hazra, M., Dasgupta Mandal, D., Mandal, T., Bhuniya, S. & Ghosh, M. Designing polymeric microparticulate drug delivery system for hydrophobic drug quercetin. *Saudi Pharmaceutical Journal* **23**, 429–436 (2015).
95. Zahoor, M., Shafiq, S., Ullah, H., Sadiq, A. & Ullah, F. Isolation of quercetin and mandelic acid from *Aesculus indica* fruit and their biological activities. *BMC Biochem* **19**, 5 (2018).
96. Devi, K. P. *et al.* Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine. *Pharmacol Res* **99**, 1–10 (2015).
97. Lim, Y.-H., Kim, I.-H. & Seo, J.-J. In vitro activity of kaempferol isolated from the *Impatiens balsamina* alone and in combination with erythromycin or clindamycin against *Propionibacterium acnes*. *J Microbiol* **45**, 473–7 (2007).
98. Riahi-Chebbi, I. *et al.* The Phenolic compound Kaempferol overcomes 5-fluorouracil resistance in human resistant LS174 colon cancer cells. *Sci Rep* **9**, 195 (2019).
99. Mylonis, I., Lakka, A., Tsakalof, A. & Simos, G. The dietary flavonoid kaempferol effectively inhibits HIF-1 activity and hepatoma cancer cell viability under hypoxic conditions. *Biochem Biophys Res Commun* **398**, 74–78 (2010).

100. Azevedo, C. *et al.* The Chemopreventive Effect of the Dietary Compound Kaempferol on the MCF-7 Human Breast Cancer Cell Line Is Dependent on Inhibition of Glucose Cellular Uptake. *Nutr Cancer* **67**, 504–513 (2015).
101. Wong, S. K., Chin, K.-Y. & Ima-Nirwana, S. <p>The Osteoprotective Effects Of Kaempferol: The Evidence From In Vivo And In Vitro Studies</p>. *Drug Des Devel Ther* **Volume 13**, 3497–3514 (2019).
102. Ren, J. *et al.* Recent progress regarding kaempferol for the treatment of various diseases (Review). *Exp Ther Med* (2019) doi:10.3892/etm.2019.7886.
103. Nejabati, H. R. & Roshangar, L. Kaempferol as a potential neuroprotector in Alzheimer's disease. *J Food Biochem* **46**, (2022).
104. Rahul & Siddique, Y. H. Neurodegenerative Diseases and Flavonoids: Special Reference to Kaempferol. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **20**, 327–342 (2021).
105. Li, R., Guo, M., Zhang, G., Xu, X. & Li, Q. Nicotiflorin reduces cerebral ischemic damage and upregulates endothelial nitric oxide synthase in primarily cultured rat cerebral blood vessel endothelial cells. *J Ethnopharmacol* **107**, 143–150 (2006).
106. Vezzani, A., French, J., Bartfai, T. & Baram, T. Z. The role of inflammation in epilepsy. *Nat Rev Neurol* **7**, 31–40 (2011).
107. Pircoveanu, D. F. V. *et al.* COGNITIVE DECLINE IN PATIENTS WITH PARKINSON'S DISEASE. *Romanian Journal of Neurology* **16**, 133–140 (2017).
108. Singh, D., Kumari, K. & Ahmed, S. Natural herbal products for cancer therapy. in *Understanding Cancer* 257–268 (Elsevier, 2022). doi:10.1016/B978-0-323-99883-3.00010-X.
109. Barve, A. *et al.* Metabolism, oral bioavailability and pharmacokinetics of chemopreventive kaempferol in rats. *Biopharm Drug Dispos* **30**, 356–365 (2009).
110. Leung, H. W.-C. *et al.* Kaempferol induces apoptosis in human lung non-small carcinoma cells accompanied by an induction of antioxidant enzymes. *Food and Chemical Toxicology* **45**, 2005–2013 (2007).
111. Nothlings, U., Murphy, S. P., Wilkens, L. R., Henderson, B. E. & Kolonel, L. N. Flavonols and Pancreatic Cancer Risk: The Multiethnic Cohort Study. *Am J Epidemiol* **166**, 924–931 (2007).

112. Lu, Y. *et al.* Integrative transcriptomics and metabolomics explore the mechanism of kaempferol on improving nonalcoholic steatohepatitis. *Food Funct* **11**, 10058–10069 (2020).
113. Williamson, G., Kay, C. D. & Crozier, A. The Bioavailability, Transport, and Bioactivity of Dietary Flavonoids: A Review from a Historical Perspective. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **17**, 1054–1112 (2018).
114. Osonga, F. J. *et al.* Antimicrobial Activity of a New Class of Phosphorylated and Modified Flavonoids. *ACS Omega* **4**, 12865–12871 (2019).
115. Zhang, Y. *et al.* HPLC Plasma Assay of a Novel Anti-MRSA Compound, Kaempferol-3-O-Alpha-L-(2",3"-di-p-coumaroyl)rhamnoside, from Sycamore Leaves.
116. Hirai, I. *et al.* Characterisation of anti-Staphylococcus aureus activity of quercetin. *Int J Food Sci Technol* **45**, 1250–1254 (2010).
117. Periferakis, A. *et al.* Kaempferol: Antimicrobial Properties, Sources, Clinical, and Traditional Applications. *Int J Mol Sci* **23**, 15054 (2022).
118. Ibitoye, O. B., Uwazie, J. N. & Ajiboye, T. O. Bioactivity-guided isolation of kaempferol as the antidiabetic principle from *Cucumis sativus* L. fruits. *J Food Biochem* **42**, e12479 (2018).
119. Franklin, S. J. & Myrdal, P. B. Solid-State and Solution Characterization of Myricetin. *AAPS PharmSciTech* **16**, 1400–1408 (2015).
120. Lin, Y. C. *et al.* Neuroprotective Effects of Ugonin K on Hydrogen Peroxide-Induced Cell Death in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *Neurochem Res* **34**, 923–930 (2009).
121. Rusak, G., Gutzeit, H. O. & Müller, J. L. Structurally related flavonoids with antioxidative properties differentially affect cell cycle progression and apoptosis of human acute leukemia cells. *Nutrition Research* **25**, 143–155 (2005).
122. Semwal, D., Semwal, R., Combrinck, S. & Viljoen, A. Myricetin: A Dietary Molecule with Diverse Biological Activities. *Nutrients* **8**, 90 (2016).
123. Xie, Y., Wang, Y., Xiang, W., Wang, Q. & Cao, Y. Molecular Mechanisms of the Action of Myricetin in Cancer. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **20**, 123–133 (2020).

124. Borde, P., Mohan, M. & Kasture, S. Effect of myricetin on deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt-hypertensive rats. *Nat Prod Res* **25**, 1549–1559 (2011).
125. Chobot, V. & Hadacek, F. Exploration of pro-oxidant and antioxidant activities of the flavonoid myricetin. *Redox Report* **16**, 242–247 (2011).
126. Serafini, M., Peluso, I. & Raguzzini, A. Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proceedings of the Nutrition Society* **69**, 273–278 (2010).
127. Zamora-Ros, R. *et al.* Dietary Intakes of Individual Flavanols and Flavonols Are Inversely Associated with Incident Type 2 Diabetes in European Populations. *J Nutr* **144**, 335–343 (2014).
128. Zhao, Z. *et al.* Myricetin relieves the symptoms of type 2 diabetes mice and regulates intestinal microflora. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **153**, 113530 (2022).
129. Hu, T. *et al.* Myricetin-induced brown adipose tissue activation prevents obesity and insulin resistance in db/db mice. *Eur J Nutr* **57**, 391–403 (2018).
130. Alam, M. A. *et al.* Effect of Citrus Flavonoids, Naringin and Naringenin, on Metabolic Syndrome and Their Mechanisms of Action. *Advances in Nutrition* **5**, 404–417 (2014).
131. Gullón, B., Lú-Chau, T. A., Moreira, M. T., Lema, J. M. & Eibes, G. Rutin: A review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability. *Trends Food Sci Technol* **67**, 220–235 (2017).
132. Negahdari, R. *et al.* Therapeutic benefits of rutin and its nanoformulations. *Phytotherapy Research* **35**, 1719–1738 (2021).

SEZNAM OBRÁZKŮ

| | | |
|------------|--|----|
| Obrázek 1 | Strukturní vzorec 2 <i>H</i> -chromenu (vlevo) a flavanu (vpravo)..... | 12 |
| Obrázek 2 | Šikimová biosyntetická cesta..... | 13 |
| Obrázek 3 | Biosyntéza od L-fenylalaninu..... | 14 |
| Obrázek 4 | Obecná struktura flavonolů..... | 15 |
| Obrázek 5 | Strukturní vzorec kvercetinu..... | 19 |
| Obrázek 6 | Strukturní vzorec kaempferolu..... | 20 |
| Obrázek 7 | Strukturní vzorec myricetinu..... | 20 |
| Obrázek 8 | Strukturní vzorec rutinu. | 21 |
| Obrázek 9 | Syntéza kvercetinu hydrolyzou rutinu. | 29 |
| Obrázek 10 | Syntéza acylovaného kvercetinu. | 30 |
| Obrázek 11 | Totální syntéza kaempferolu..... | 31 |
| Obrázek 12 | Příklad syntézy myricetinu..... | 32 |
| Obrázek 13 | Syntéza hexasubstituovaného derivátu rutinu..... | 34 |
| Obrázek 14 | Možné účinky kvercetinu na lidské tělo. | 41 |
| Obrázek 15 | Možné účinky kaempferolu na lidské tělo. | 43 |
| Obrázek 16 | Možné účinky myricetinu na lidské tělo..... | 46 |
| Obrázek 17 | Možné účinky rutinu na lidské tělo..... | 47 |

SEZNAM TABULEK

| | |
|--|----|
| Tabulka 1 Přehled známých flavonolů. | 15 |
| Tabulka 2 Přehled známých flavonolových glykosidů..... | 17 |