

POLYFENOLY JABLK

MIROSLAV ONDREJOVIČ^{a,b}, TIBOR MALIAR^{a,b}, ĽUDOVÍT POLÍVKA^a
a STANISLAV ŠILHÁR^b

^a Katedra biotechnológií, Fakulta prírodných vied, Univerzita sv. Cyrila a Metoda, J. Herdu 2, 917 01 Trnava,

^b Výskumný ústav potravinársky, Bratislava, Biocentrum, Kostolná 5, 900 01 Modra, Slovensko
ondrejovic@vup.sk

Došlo 17.5.07, prepracované 21.2.08, prijaté 25.2.08.

Kľúčové slová: polyfenoly, jablká, izolácia

Obsah

1. Úvod
2. Polyfenoly jablk
 - 2.1. Fenolové kyseliny
 - 2.2. Flavonoidy
3. Metódy izolácie polyfenolov
 - 3.1. Úprava vstupnej suroviny
 - 3.2. Voľba extrakčnej metódy
4. Záver

1. Úvod

Jablká sa zaraďujú do čeľade *Rosaceae* (ružovité), podčeľade *Pomoideae* (jabloňové) a tvoria samostatný rod *Malus* s väčším počtom druhov. Pôvod dnešných kultivarov patrí botanicky do druhu *Malus domestica* Borkh. – jablň domáca¹. Už od nepamäti je jablko súčasťou ľudskej stravy. I keď jablone patria medzi ovocné stromy pestované hlavne v miernom podnebnom pásme a iba výnimočne sa vyskytujú v chladnejších oblastiach, konzumujú sa takmer na celom svete a to tak v natívnom stave ako aj vo forme rôznych jablčných výrobkov (šťavy, mušty, destiláty, džem, ocot).

Z mnohých epidemiologických štúdií vyplýva, že konzumácia ovocia a teda aj jablk pomáha pri znižovaní rizika vzniku širokej palety chronických ochorení, akými sú napríklad rakovina, kardiovaskulárne ochorenia, astma a cukrovka^{2,3}. Konzumácia jablk sa tiež spája so znižovaním hmotnosti, zlepšením funkcie pľúc⁴ a celkového zdravotného stavu konzumentov⁵.

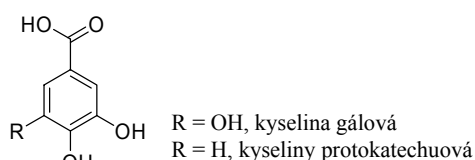
Hlavnými zložkami jablk, ktoré sú v literatúre charakterizované ako biologicky významné sekundárne metabolity zodpovedné za pozitívne účinky na ľudské zdravie, sú polyfenolové látky. Tak ako ostatné sekundárne metabolity

rastlín sú i polyfenoly produkované počas bežného vývoja a v odozve na stresové podmienky (infekcia, poranenie, UV žiarenie, zvýšená salinita pôdy a prítomnosť ťažkých kovov v prostredí). Ich biosyntetické dráhy vychádzajú z fenylalanínu a tyrozínu.

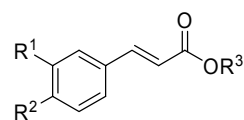
Polyfenoly sú v rastlinách na úrovni pletív, celulárnych a subcelulárnych jednotiek nerovnomerne rozmiesťtvené. Zatiaľ čo nerozpustné polyfenoly (prevažne ligníny) sú súčasťami bunkových stien a tvoria mechanickú oporu rastlinnej hmoty⁶, rozpustné fenolové látky sú začlenené vo vakuolách a špeciálnych plastidoch^{7,8}. V rastlinách tieto látky pôsobia ako ochrana voči UV žiareniu ale tiež ako fytoalexíny, antifeedanty, atraktanty pre opel'ovačov, pigmenty a antioxidanty.

2. Polyfenoly jablk

Polyfenolové látky jablk možno funkčne rozdeliť do dvoch veľkých skupín, a to skupina fenolových kyselín zahŕňajúca deriváty kyseliny benzoovej (kyselina galová a protokatechuová, obr. 1) a deriváty kyseliny škoricovej (kyselina kumárová, kávová, ferulová, chlorogénová, kumaroylchinónová, obr. 2), a skupina flavonoidov pozostávajúca z flavanolov (kvercetin, izoramnetín a ich glykozidy), flavan-3-olov (katechín, epikatechín, prokyanidíny), dihydrochalkónov (floreťín a jeho glykozidy) a antokyanínov (kyanidín a jeho glykozidy)^{2,9}.



Obr. 1. Deriváty kyseliny benzoovej vyskytujúce sa v jablkách



R¹ = H, R² = OH, R³ = H, k. kumárová
R¹ = OH, R² = OH, R³ = H, k. kávová
R¹ = OH, R² = OCH₃, R³ = H, k. ferulová
R¹ = OH, R² = OH, R³ = k. chinónová, k. chlorogénová
R¹ = H, R² = OH, R³ = kyselina chinónová, k. kumaroylchinónová

Obr. 2. Deriváty kyseliny škoricovej nachádzajúce sa v jablkách

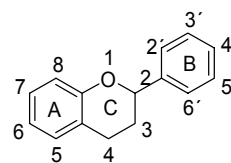
2.1. Fenolové kyseliny

Skupina fenolových kyselín sa delí na základe ich chemickej štruktúry na deriváty kyseliny benzoovej a deriváty kyseliny škoricovej. Deriváty kyseliny benzoovej sa v rastlinách vyskytujú len veľmi zriedkavo. Výnimkou je ovocie a niektoré druhy zeleniny (čierna reďkovka, cibuľa). V týchto komoditách dosahuje koncentrácia derivátov kyseliny benzoovej až niekoľko desiatok miligramov na kilogram natívnej rastlinnej hmoty¹⁰. V prírode sú prítomné prevažne viazané so sacharidmi alebo organickými kyselinami. V jablkách sa nachádzajú hlavne dva deriváty kyseliny benzoovej, a to kyselina protocatechuová a kyseliny galové vyskytujúca sa vo forme hydrolyzovateľných tanínov (galotaníny a elagitaníny). Biologické vlastnosti týchto látok nie sú síce doposiaľ dostatočne preskúmané¹⁰, no napriek tomu už boli publikované antioxidačné¹¹, protizápalové účinky galotanínu inhibíciou expresie chymikínov a cytokínov na molekulovej i molekulárno-biologickej úrovni^{12,13}, antikancerogénne¹⁴ a hypolipidemické účinky inhibíciou skvalénovej dráhy v mieste syntézy farnesyly¹⁵.

Deriváty kyseliny škoricovej sa častejšie vyskytujú ako deriváty kyseliny benzoovej. V natívnom rastlinnom materiáli sa len výnimočne nachádzajú vo voľnej forme, zväčša sú naviazané na sacharidovú časť alebo esterovo viazané s kyselinou chinovou, šikimovou a tartarovou. Ich uvoľnenie zo spomínaných foriem nastáva počas mrazenia, sterilizácie alebo fermentácie daného rastlinného materiálu. Jablká spolu s čučoriedkami, slivkami a čerešňami patria medzi ovocie s najvyššími koncentraciami derivátov kyseliny škoricovej, medzi ktoré zaraďujeme hlavne kyselinu kumárovú, ferulovú, kumaroylchinónovú, kávovú a kyselinu chlorogénovú, ktorej koncentrácia v jablkách sa pohybuje v rozsahu 0,5–2 g kg⁻¹ natívnej hmoty¹⁰. Z biologických účinkov derivátom kyseliny škoricovej je asi najznámejšia protinádorová aktivita¹⁶. Okrem nej je známy tiež imunosupresívny účinok¹⁷, inhibičná aktivita voči skupine enzýmov trypsínovej rodiny (príkladom môže byť trypsin spôsobujúci pankreatitídu), trombínu, plazmínu, hemokoagulačných faktorov (pri poruchách koagulácie a fibrinolýzy), faktorom komplementu (pri autoimunitných ochoreniach) a dokonca voči niektorým derivátom schopným zasahovať do hormonálnych procesov prostredníctvom interakcie s príslušnými receptormi¹⁸.

2.2. Flavonoidy

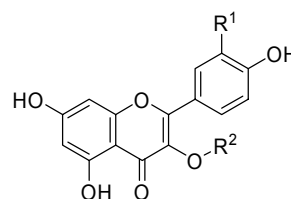
V súčasnosti je známych viac ako 6400 rôznych flavonoidov vyskytujúcich sa v rastlinnej ríši¹⁹. Ich základnú štruktúru tvorí flavánové jadro alebo 2-fenyl-benzo- γ -pyrán (obr. 3). Táto štruktúra je charakteristická pre 3-deoxyflavonoidy (flavóny, flavanóny, izoflavóny a neoflavóny) a 3-hydroxyflavonoidy (flavonoly, antokyaníny, flavan-3,4-dioly a flavan-3-oly). Flavonoidy sa najčastejšie vyskytujú vo forme glykozidov, nakoľko táto forma im umožňuje vyššiu rozpustnosť v bežných fyziologických podmienkach rastlinnej bunky²⁰ a zároveň znižuje ich reak-



Obr. 3. Základná štruktúra flavonoidov – flavánové jadro

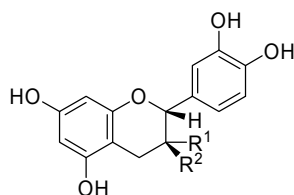
tivitu a zabezpečuje lepšiu stabilitu¹⁹. Naviac, ako uvádzajú Van Buren a spol.²¹, glykozidy flavonoidov nie sú substrátom pre polyfenoloxidázu a teda nepodliehajú tzv. enzýmovému hnednutiu, nakoľko bolo zistené, že cukorná zložka naviazaná na flavonoidový skelet sterickejšie prekáža tomuto enzýmu. Glykozidovou časťou flavonoidov býva obvykle glukóza, galaktóza, ramnóza, xylóza a arabinóza¹⁹.

Flavonoly sú prítomné približne v 80 % vyšších rastlín. Keďže ich biosyntéza je stimulovaná svetlom, nachádzajú sa vo vonkajších obalových pletivách. Sfarbenie flavonolov (vrátane glykozidov) sa pohybuje od slonovinej až po žltú²². V jablkách sú flavonoly zastúpené hlavne kvercetínom a izoramnetínom (3'-O-metyl derivát kvercetínu) (obr. 4). V ovoci sa často ten istý flavonol vyskytuje viazaný na rôzne sacharidy a často vytvára paletu 5 až 10 rôznych glykozidov¹⁰. Vhodným príkladom tohto tvrdenia sú i jablká, Alonso-Salces a spol.⁹ zistili, že vzorka testovaných jabĺk obsahovala šesť rôznych glykozidov kvercetínu a šesť rôznych glykozidov izoramnetínu. Kvercetín a izoramnetín vykazujú antioxidačnú, protirakovinovú, protizápalovú²³ a antimikrobiálnu aktivitu dokázanú *in vitro* ako aj *in vivo*. Okrem toho je známa ich inhibičná aktivita voči špecifickým enzýmom: cyklooxygenázy-1 (COX-1), cyklooxygenázy-2 (COX-2)²⁴, aromátázy, adenylát cyklázy, topoizomerázy, NO syntetázy (NOS-II), proteín kinázy a kalmodulínu, ktoré sú označované ako efekторы zápalových a nádorových ochorení^{25,26}. Okrem



- R¹ = OH, R² = H, kvercetín
 R¹ = OH, R² = galaktóza, kvercetín-3-O-galaktozid
 R¹ = OH, R² = glukóza, kvercetín-3-O-glukozid
 R¹ = OH, R² = ramnóza, kvercetín-3-O-ramnozid
 R¹ = OCH₃, R² = H, izoramnetín
 R¹ = OCH₃, R² = glukóza, izoramnetín-3-O-glukozid
 R¹ = OCH₃, R² = ramnoglukóza, izoramnetín-3-O-ramnoglukozid

Obr. 4. Flavonoly vyskytujúce sa v jablku



R¹ = H, R² = OH, katechín
R¹ = OH, R² = H, epikatechín

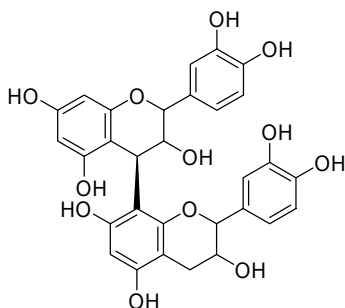
Obr. 5. Flavan-3-oly nachádzajúce sa v jablkách

toho vykazujú i inhibičnú účinnosť voči HIV integrázy, reverznej transkriptázy, HIV proteinázy²⁷.

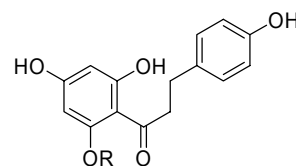
Kvercetin pôsobí tiež ako inhibítor oxidácie LDL (low density lipoprotein) *in vitro*, pri imunologických odpovediach rôzneho typu a spolu s ostatnými flavonoidmi je účinný proti širokému spektru civilizačných ochorení²⁵. Interakcie kvercetinu s DNA sa predpokladajú prostredníctvom hydrofóbnej časti jeho molekuly²⁸.

Flavan-3-oly sa vyskytujú vo voľnej (katechíny) alebo polymerénej forme (proantokyandíny) (obr. 5). Výrazným znakom tejto skupiny flavonoidov je to, že netvoria glykozidy. Katechíny sa nachádzajú v rôznych druhoch ovocia¹⁰. V jablkách sa ich koncentrácia pohybuje od 2,6 do 9,6 mg g⁻¹ sušiny²⁹. Vyskytujú sa tu prevažne epiméry katechín a epikatechín. Ich funkcia je pravdepodobne nasmerovaná na ochranu rastliny, pretože, ako uvádzajú Bais a spol.³⁰, katechín i epikatechín vykazujú antioxidačnú^{31–33}, antibakteriálnu a antivírusovú aktivitu^{34,35}. Vo farmaceutickom výskume bola zistená ich antialergická³⁶, protinádorová^{37,38}, hepato- a gastroprotektívna^{36,39} a anti-koagulačná aktivita⁴⁰. V kontraste s glykozylovanými flavonolmi sú flavan-3-oly veľmi dobrým substrátom pre polyfenoloxidázu.

Prokyanidíny (taníny) predstavujú dimérne, oligomérne a polymérne štruktúry katechínových jednotiek pospájaných C4 a C8 (prípadne C6) väzbami¹⁰ (obr. 6). Známa je tvorba esterov s kyselinou galovou⁴¹. V jablčnom mušle sa stupeň polymerizácie týchto látok pohybuje od 4 do 11



Obr. 6. Prokyanidín B2 – predstaviteľ dimérnych katechínových štruktúr spojených C4–C8 väzbou



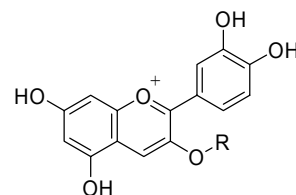
R = H, floretín
R = glukóza, floridzín
R = xyloglukóza, floretín-2'-O-xyloglukozid

Obr. 7. Dihydrochalkóny vyskytujúce sa v jablkách

jednotiek. Taníny vďaka schopnosti tvoriť komplexné zlúčeniny s proteínmi nachádzajúcimi sa v slinách sú zodpovedné za horkastú chuť jabĺk a jablčných štiav^{10,42}. Vykazujú predovšetkým antioxidačnú aktivitu a schopnosť vychytávať reaktívne formy kyslíka a dusíka. Sú tiež známe ich imunomodulačné funkcie^{41,43}.

Floretín je dihydrochalkón, ktorý sa výlučne vyskytuje v jablkách, a to prevažne vo forme glukozidu, presnejšie 5-O-glukozidu floretínu (floridzín) (obr. 7). Floridzín je prítomný predovšetkým v semenách, stonkách, listoch a len v minimálnych množstvách v šupke či dužine. Najčastejšie popisovaný biologický účinok floridzínu je inhibícia sorbie glukózy v intestinálnom trakte prostredníctvom kotransportéru 1-D-glukózy (SGLT1). Táto vlastnosť klasifikuje floridzín ako antidiabetické činidlo. Floretín tiež inhibuje proteín GLUT2 zabezpečujúci ľahší transport glukózy nachádzajúci sa na bázoaterálnom reťazci enterocytov⁴⁴. Cowan⁴⁵ popisuje floretín ako antimikrobiálnu látku so širokým spektrom účinnosti, zatiaľ čo Ehrenkranz a spol.⁴⁶ ho označili za fungicídnu zlúčeninu.

Antokyaníny (obr. 8) dodávajú rastlinám ich charakteristické sfarbenie (ružové, oranžové, červené, modré, fialové). Nachádzajú sa rozpustené vo vakuolách epidermálnych a subepiderálnych buniek kvetov a plodov a niekedy aj vo sférických váčkoch nazývaných antokyanoplasty⁸. Antokyaníny sa vyskytujú v rovnováhe štyroch molekulárnych foriem: červený flaviínový kation, bezfarebná pseudobáza, bezfarebný chalkón a modrá chi-



R = H, kyanidín
R = galaktóza, kyanidín-3-galaktosid

Obr. 8. Antokyaníny nachádzajúce sa v jablku

noidná báza. Ich farba je silne závislá na pH⁴⁷. Vo forme aglykónov sú vysoko nestabilné, a preto sa najčastejšie vyskytujú v glykozidovej forme (glukóza v polohe 3), prípadne stabilizované esterovou väzbou s rôznymi alifatickými (kyselina citrónová a jablčná) či aromatickými kyselinami (deriváty kyseliny škoricovej a benzoovej), čím vzrastá ich tolerancia k svetlu, pH a podmienkam oxidačného stresu. Jednou z ďalších možností stabilizácie antokyanínov je tvorba komplexov s inými flavonoidmi (kopigmentácia). V ľudskej strave sa nachádzajú v ovoci a zelenine prevažne v šupkách a len ojedinele v dužine (čerešne a jahody). V jablkách sa vyskytuje kyanidín v koncentrácii približne 2–4 g kg⁻¹ natívnej hmoty¹⁰. Biologické aktivity antokyanidínov sú publikované veľmi široko, z veľkého množstva publikovaných prác možno spomenúť antioxidačné účinky⁴⁸, protinádorové účinky⁴⁹ ako aj gastroprotektívne, anticeluratívne účinky⁵⁰.

3. Metódy izolácie polyfenolov

Rastlinný materiál je tak fyzikálne ako aj látkovo heterogénna surovina vyznačujúca sa rôznorodosťou bunkovej štruktúry. Z hľadiska extrakcie je možné deliť rastlinný materiál na dve časti: (i) stavebný materiál (skelet bunky) a (ii) fytochemikálie vyskytujúce sa v bunkách ako aj v medzibunkovom priestore⁵¹.

Extrakciu fenolových látok z rastlinného materiálu môžu výrazne ovplyvňovať:

- fyzikálno-chemické vlastnosti, kde je možné vykonať predikciu na základe poznania chemickej štruktúry žiadaného fenolu,
- spôsob predúpravy materiálu (sušenie, mrazenie, homogenizácia) má vplyv na zloženie, stabilitu extrahovaných látok a rýchlosť prenosu hmoty pri extrakcii^{51,52},
- voľba extrakčnej metódy je významná hlavne vzhľadom k výťažnosti a náročnosti následnej izolácie a purifikácie polyfenolov^{53,54}.

Keďže fenolové látky v rámci jednotlivých tried i v rámci celej skupiny majú zabudované vo svojom skelete podobné chemické štruktúry, je možné predpokladať, že extrakty rastlinného materiálu budú vždy zmesou rôznych tried fenolových látok, ktoré sú rozpustné za daných podmienok. Preto sa pri izolácii fytochemikálií často všeobecne zaraďujú kroky slúžiace na odstránenie neželaných fenolových látok a tiež nefenolových zlúčenín vystupujúcich ako nečistoty vo výslednom extrakte (napríklad vosky, tuky, terpény a chlorofyly)⁵⁵.

3.1. Úprava vstupnej suroviny

Na získanie maximálnych výťažkov extrakcie je vhodné pred extrakciou daný rastlinný materiál vhodne uskladniť a upraviť. Mrazenie a lyofilizácia vzorky sa volí hlavne v prípadoch, ak izolované látky môžu podliehať nežiadúcim enzymatickým reakciám v samotnom rastlinnom materiáli prípadne prostredníctvom mikrobiálnej

kontaminácie. Inou možnosťou uchovania extrakčného materiálu pred rozkladom je sušenie, ktoré však v určitých prípadoch znižuje výťažnosť extrakcie (napríklad katechínov) a navyš je tu možnosť tepelného rozkladu žiadaných zlúčenín⁵¹.

Predextrakčná úprava vzorky predstavuje odstránenie bariér brániacich difúzii extrahovaných látok. V rastlinných pletivách sú to hlavne membránové útvary a medzibunková pojivová hmota (extracelulárny matrix). Na uľahčenie difúzných procesov pri extrakcii sa často využíva homogenizácia rastlinného materiálu⁵². Vo všeobecnosti poznáme dva typy homogenizácie a to fyzikálnu a chemickú homogenizáciu.

Medzi fyzikálne homogenizačné metódy môžeme zaradiť mechanické rozdrobenie vzorky (na rôzne veľké výsledné častice), sušenie a zmrazovanie. Sušením sa narušujú membránové útvary a vznikajú v nich otvory, cez ktoré môžu intracelulárne látky ľahšie prechádzať do extraktu. Zmrazovanie okrem toho, že je výhodnou možnosťou uchovania rastlinného materiálu, patrí medzi homogenizačné postupy, pretože pri znížení teploty pod bod tuhnutia vody sa v bunkách rastlinného materiálu vytvárajú kryštály ľadu narušujúce integritu buniek, čím sa po rozmrazení uľahčí extrakčný proces⁵².

Hlavnou chemickou homogenizačnou metódou predúpravy vzorky je extrakcia rastlinného materiálu lipofilným rozpúšťadlom. Používa sa hlavne pri vzorkách s vysokým obsahom lipidových zlúčenín. Keďže enzýmy sú zaraďované medzi katalyzátory chemických reakcií, je možné do tejto skupiny zaradiť enzýmovú hydrolýzu bunkových stien. Na tento účel sa používajú hlavne pektínázy a celulázy, ktoré rozrušujú pektíny a celulózu ako hlavné stavebné kamene bunkových stien a medzibunkovej pojivovej hmoty rastlinných pletív.

Uvedené kroky predúpravy vzorky možno vzájomne kombinovať a meniť podmienky, pri ktorých jednotlivé procesy prebiehajú (napríklad pri sušení teplota a doba sušenia). V literatúre sa zväčša používajú sušenie a následná mechanická homogenizácia alebo už autori priamo vychádzajú zo sušeného materiálu vo forme prášku⁵².

3.2. Voľba extrakčnej metódy

Extrakčná metóda zahŕňa niekoľko parametrov výrazne vplyvujúcich na kvantitatívnu a kvalitatívnu kompozíciu extraktov. Medzi najdôležitejšie parametre extrakčných metód patria – voľba extrakčného činidla, pH prostredia, teplota extrakcie, pomer množstva materiálu k množstvu extrakčného činidla, počet stupňov a doba extrakcie.

Voľba extrakčného činidla závisí na rozpustnosti extrahovanej zložky⁵¹. Rozpustnosť fenolových látok v danom rozpúšťadle je určená jej fyzikálno-chemickými vlastnosťami, stupňom glykozylácie fenolových látok alebo ich prítomnosťou vo forme Na solí reakciou s polárnymi bázami sa zvyšuje ich rozpustnosť v polárnych rozpúšťadlách. Menej polárne aglykóny, akými sú izoflavóny, flavanóny, a vyššie metoxylované flavó-

ny a flavonoly, sú rozpustnejšie v nepolárnych rozpúšťadlách. Preto neexistuje univerzálny postup na izoláciu všetkých polyfenolov, prípadne špecificky jednej triedy týchto látok z rastlinného materiálu⁵⁶.

Pri získavaní polyfenolov sa často používa extrakcia vodou (pH 1,5–10), metanolom⁵⁷, etanolom⁵⁸ a acetónom⁵⁹ s následnou extrakciou lipofilnými organickými rozpúšťadlami (*n*-hexán, benzén, chloroform, etylacetát, dietyléter) volenými na základe fyzikálnych vlastností žiadaných fenolových látok^{19,59}. Menej sa používajú propanol, *n*-butanol a dimetylformamid⁶⁰ prípadne dichlórmetán⁶¹. Známe sú i extrakčné činidlá tvorené vodným roztokom metanolu⁶², etanolu⁶³, acetónu⁶⁴ a izopropanolu⁶⁵ a kombináciou spomínaných rozpúšťadiel⁶⁶.

Hodnota pH prostredia extrakcie je významná hlavne vo väzbe na rozpustnosť cieľových zlúčenín pri danom pH. Je vo všeobecnosti známe, že pri pH približne 10 sa vyskytuje väčšina organických kyselín vo forme solí, pri pH 2 je vo forme solí väčšina organických báz, ktoré sú vo vodnom prostredí vysoko rozpustné a naopak nedostupné pre organické rozpúšťadlo.

Teplota extrakcie významne ovplyvňuje výsledný extrakt. Vyššie teploty umožňujú zvýšiť permeabilitu buniek, difúzny koeficient a rozpustnosť extrahovaných látok, ale tiež skrátiť dobu extrakcie a znížiť viskozitu systému. Avšak teploty príliš vysoké môžu spôsobiť rozklad žiadaných látok^{19,52} prípadne zvyšovať rýchlosť nežiadúcich reakcií (oxidačné reakcie pri izolácii polyfenolov), ktoré sa dajú čiastočne tlmiť prídavkom špecifických látok (napríklad butylhydroxytoluén – BHT). V práci Graziani a spol.⁶⁷ sa extrahovali polyfenolové látky z vymrazených jabĺk s 1% metanolovým roztokom BHT.

Pomer množstva materiálu k množstvu výluhu sa volí na základe sorpčnej schopnosti tuhej fázy a rozpustnosti extrahovaných látok⁵¹. Je veľmi dôležité zvoliť správny pomer, nakoľko príliš nízky pomer spôsobuje nedostatočné vyčerpanie suroviny a príliš vysoký pomer môže zhoršiť ďalšiu prácu s extraktom, nakoľko sa do extraktu môže extrahovať väčšie množstvo balastných látok. V štúdií Shahidi a Naczek⁶⁸ sa zistilo, že pri extrakcii kanoly so 70% acetónom zmena pomeru medzi náväzkom rastlinného materiálu a extrakčným činidlom z 1:5 na 1:10 zvýšilo výťažnosť extrakcie kondenzovaných tanínov z 257,3 mg na 321,3 mg/100 g suroviny a celkových polyfenolov z 773,5 mg na 805,8 mg/100 g suroviny.

S počtom extrakčných stupňov stúpa výťažnosť extrakcie. To znamená, že je efektívnejšie extrahovať to isté množstvo materiálu štyrikrát s 50 ml ako jedenkrát s 200 ml rozpúšťadla. Kvantitatívne výťažky sú získavané maximálne 3–5 stupňovou extrakciou. Ďalšie extrakcie sa stávajú neefektívne vzhľadom na množstvo vyextrahovaných látok⁵².

Doba extrakcie sa pohybuje v závislosti od druhu a spôsobu predúpravy rastlinného materiálu a rozpustnosti cieľových zlúčenín od 30 sekúnd až po 2 týždne⁶².

Izolačné postupy získavania polyfenolových látok jabĺk sú v súlade s uvedenými extrakčnými postupmi aplikovateľnými na iné rastlinné materiály^{69–74}.

4. Záver

Z uvedeného je zjavné, že polyfenolové látky jabĺk vykazujú širokú paletu biologických účinkov. Tieto látky je možné získať rôznymi izolačnými postupmi, a to tak zo zrelých a nezrelých jabĺk, ako aj z odpadu po spracovaní jabĺk vznikajúceho pri výrobe jablkových štiav a koncentrátov obsahujúceho relatívne veľké zostatkové množstvo polyfenolových látok (floridzín, kyselina chlorogénová, epikatechín a glykozidy kvercetínu). Pripravené preparáty je možné využiť tak v potravinárskom priemysle vo forme aditívnych prísad do potravín na stabilizáciu a zlepšenie senzorických vlastností potravín, ako aj vo farmaceutickom priemysle ako prírodné preparáty použiteľné na liečenie niektorých civilizačných ochorení, alebo na preventívno-lekárské účely.

LITERATÚRA

1. Cifranič P., Hnádzik F., Hričovský I., Župník M.: *Poľnohospodárstvo. Príroda*, Bratislava 1978.
2. Aprikian O., Duclos V., Guyot S., Besson C., Manach C., Bernalier A., Morand C., Rémésy C., Demigné C.: *J. Nutr.* 133, 1860 (2003).
3. Shoji T., Akazome Y., Kanda T., Ikeda M.: *Food Chem. Toxicol.* 42, 959 (2004).
4. Shaheen S. O., Sterne J. A. C., Thompson R. L., Songhurst C. E., Margetts B. M., Burney P. G. J.: *Am. J. Respir. Critical Care Medicine* 164, 1823 (2001).
5. Boyer J., Liu R. H.: *Nutr. J.* 3, 1 (2004).
6. Häkkinen S.: *Dissertation*. University of Kuopio, Kuopio 2000.
7. Beckman C. H.: *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 57, 101 (2000).
8. Harborne J. B.: *The Flavonoids*. Chapman and Hall, London 1994.
9. Alonso-Salces R. M., Ndjoko K., Queiroz E. F., Ioset J. R., Hostettmann K., Berrueta L. A., Gallo B., Vicente F.: *J. Chromatogr. A* 1046, 89 (2004).
10. Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L.: *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 727 (2004).
11. Wei T., Sun H., Zhao X., Hou J., Hou A., Zhao Q., Xin W.: *Life Sci.* 70, 1889 (2002).
12. Erdölyi K., Kiss A., Bakondi E., Bai P., Szaböl C., Gergely P., Erdödi F., Virag L.: *Mol. Pharmacol.* 68, 895 (2005).
13. Rapizzi E., Fossati S., Moroni F., Chiarugi A.: *Mol. Pharmacol.* 66, 890 (2004).
14. Al-Ayyoubi S., Gali-Muhtasib H.: *Mol. Carcinog.* 46, 176 (2007).
15. Chen X., Hasuma T., Yano Y., Yoshimata T., Morishima Y., Wang Y., Otani S.: *Anticancer Res.* 17, 2555 (1997).
16. Akao Y., Maruyama H., Matsumoto K., Ohguchi K., Nishizawa K., Sakamoto T., Araki Y., Mishima S., Nozawa Y.: *Biol. Pharm. Bull.* 26, 1057 (2003).
17. Tsuzurahara K.: *Chem. Pharm. Bull.* 25, 102 (1977).
18. Chang H. K., Hsu F. L., Liu I. M., Cheng J. T.: *J.*

- Pharm. Pharmacol. 55, 833 (2003).
19. Shi J., Nawaz H., Pohorly J., Mittal G., Kakuda Y., Jiang Y.: Food Rev. Int. 21, 139 (2005).
 20. Erlund I.: *Dissertation*, University of Helsinki, Helsinki 2002.
 21. Van Buren J., De Vos L., Pilnik W.: J. Agric. Food Chem. 24, 448 (1976).
 22. Harborne J. B.: *Comparative Biochemistry of The Flavonoids*. Academic Press, London 1967.
 23. Boyer J., Brown D., Liu R. H.: Nutr. J. 11, 1 (2005).
 24. Mutoh M., Takahashi M., Fukuda K., Matsushima-Hibiya Y., Mutoh H., Sugimura T., Wakabayashi K.: Carcinogenesis 21, 959 (2000).
 25. Formica J. V., Regelson W.: Chem. Toxicol. 33, 1061 (1995).
 26. Mamani-Matsuda M., Rambert J., Malvy D., Lejoly-Boisseau H., Daulouéde S., Thiolat D., Coves S., Courtois P., Vincendeau P., Mossalayi M. D.: Antimicrob. Agents Chemother. 48, 924 (2004).
 27. Middleton E. Jr., Kandaswami C., Theoharis T. C.: Pharmacol. Rev. 52, 673 (2000).
 28. Mendoza-Wilson A. M., Glossman-Mitnik D.: J. Mol. Struct. (Theochem) 681, 71 (2004).
 29. Schieber A., Hilt P., Streker P., Endress H. U., Rentschler C., Carle R.: Innovative Food Sci. Emerging Technol. 4, 99 (2003).
 30. Bais H. P., Walker T. S., Stermitz F. R., Hufbauer R. A., Vivanco J. M.: Plant Physiol. 128, 1173 (2002).
 31. Rossetto M., Vanzani P., Mattivi F., Lunelli M., Scarpa M., Rigo A.: Arch. Biochem. Biophys. 408, 239 (2002).
 32. Pedrielli P., Skibsted L. H.: J. Agric. Food Chem. 50, 7138 (2002).
 33. Singh D., Chander V., Chopra K.: Pharmacol. Rep. 57, 70 (2005).
 34. Hisano M., Yamaguchi K., Inoue Y., Ikeda Y., Iijima M., Adachi M., Shimamura T.: Arch. Dermatol. Res. 295, 183 (2003).
 35. Mantani N., Imanishi N., Kawamata H., Terasawa K., Ochiai H.: Planta Med. 67, 240 (2001).
 36. Shiozaki T., Sugiyama K., Nakazato K., Takeo T.: Yakugaku Zasshi 117, 448 (1997).
 37. Conte A., Pellegrini S., Tagliazucchi D.: Drugs Exp. Clin. Res. 29, 243 (2003).
 38. Fan X. J.: Zhonghua Zhong Liu Za Zhi 14, 190 (1992).
 39. Perrissoud D., Maignan M. F., Dumont J. M.: Liver 5, 55 (1985).
 40. He Y. S.: Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi 2, 15 (1982).
 41. Hammerstone J. F., Lazarus S. A., Schmitz H. H.: J. Nutr. 130, 2086 (2000).
 42. Vidal S., Francis L., Guyot S., Marnet N., Kwiatkowski M., Gawel R., Cheynier V., Waters E. J.: J. Sci. Food Agric. 83, 564 (2003).
 43. Akiyama H., Sato Y., Watanabe T., Nagaoka M. H., Yoshioka Y., Shoji T., Kanda T., Yamada K., Totsuka M., Teshima R., Sawada J., Goda Y., Maitani T.: Federation Eur. Biochem. Soc. 579, 4485 (2005).
 44. Crespy V., Aprikian O., Morand Ch., Besson C., Manach C., Demigné C., Rémésy C.: Nutrient Metabolism – Res. Commun. 2001, 3227.
 45. Cowan M. M.: Clin. Microbiol. Rev. 12, 564 (1999).
 46. Ehrenkranz J. R. L., Lewis N. G., Kahn C. R., Roth J.: Diabetes Metab. Res. Rev. 21, 31 (2005).
 47. Clifford M. N.: J. Sci. Food Agric. 80, 1063 (2000).
 48. Afaq F., Syed D. N., Malik A., Hadi N., Sarfaraz S., Kweon M. H., Khan N., Zaid M. A., Mukhtar H.: J. Invest. Dermatol. 127, 222 (2007).
 49. Lin X.X., Zhu S.M.: Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 30, 1147 (2005).
 50. Magistretti M. J., Conti M., Cristoni A.: Arzneimittelforschung 38, 686 (1988).
 51. Hanika J.: *Speciální separační procesy*. VŠCHT, Praha 1999.
 52. Santos-Buelga C., Williamson G.: *Methods in Polyphenol Analysis*. Royal Society of Chemistry, Cambridge 2003.
 53. Yrjönen T.: *Dissertation*. University of Helsinki, Helsinki 2004.
 54. Peng J., Fan G., Chai Y., Wu Y.: J. Chromatogr., A 1102, 44 (2006).
 55. Robbins R. J.: J. Agric. Food Chem. 51, 2866 (2003).
 56. Robards K., Antolovich M.: Analyst 112, 11 (1997).
 57. Delaporte R. H., Sarragiotto M. H., Takemura O. S., Sánchez G. M., Filho B. P. D., Nakamura C. V.: J. Ethnopharmacol. 95, 229 (2004).
 58. Ponce M. A., Scervino J. M., Erra-Balsells R., Ocampo J. A., Godeas A. M.: Phytochemistry 65, 1925 (2004).
 59. Martini N. D., Katerere D. R. P., Eloff J. N.: J. Ethnopharmacol. 93, 207 (2004).
 60. Nacz M., Shahidi F.: J. Chromatogr., A 1054, 95 (2004).
 61. Mendoza L., Wilkens M., Urzúa A.: J. Ethnopharmacol. 58, 85 (1997).
 62. Nitta T., Arai T., Takamatsu H., Inatomi Y., Murata H., Iinuma M., Tanaka T., Ito T., Asai F., Ibrahim I., Nakanishi T., Watabe K.: J. Health Sci. 48, 273 (2002).
 63. Pessini G. L., Filho B. P. D., Nakamura C. V., Cortez D. A. G.: Mem. Inst. Oswaldo Cruz 98, 1115 (2003).
 64. Rauha J. P.: *Dissertation*. University of Helsinki, Helsinki 2001.
 65. Kim K. H., Lee K. W., Kim D. Y., Park H. H., Kwon I. B., Lee H. J.: Bioresour. Technol. 96, 1709 (2005).
 66. Molnár-Perl I., Füzfa Z.: J. Chromatogr., A 1073, 201 (2005).
 67. Graziani G., D'Argenio G., Tuccillo C., Loguercio C., Ritieni A., Morisco F., Del Vecchio Blanco C., Fogliano V., Romano M.: Gut 54, 193 (2005).
 68. Nacz M., Shahidi F., Sullivan A.: Food Chem. 45, 51 (1992).
 69. Alonso-Salces R. M., Korta E., Barranco A., Berrueta L. A., Gallo B., Vicente F.: J. Chromatogr., A 933, 37 (2001).
 70. Guyot S., Marnet N., Laraba D., Sanoner P., Drilleau

- J. F.: *J. Agric. Food Chem.* **46**, 1698 (1998).
71. Guyot S., Doco T., Souquet J. M., Moutounet M., Drilleau J. F.: *Phytochemistry* **44**, 351 (1997).
72. Lachman J., Hamouz K., Čepl J., Pivec V., Šulc M., Dvořák P.: *Chem. Listy* **100**, 522 (2006).
73. Cvengroschová M., Šmogrovičová D.: *Chem. Listy* **101**, 287 (2007).
74. Šulc M., Lachman J., Hamouz K., Orsák M., Dvořák P., Horácková V.: *Chem. Listy* **101**, 584 (2007).

M. Ondrejovič^{a,b}, T. Maliar^{a,b}, E. Polívka^a, and S. Šilhár^b (^a*Department of Biotechnologies, Faculty of Natural Sciences, University of St. Cyril and Methodius, Trnava, Slovak Republic*, ^b*Food Research Institute, Bio-centre, Modra, Slovak Republic*): **Apple Polyphenols**

The short review is focused on apple polyphenols – their classification, biological activities and methods of isolation. The polyphenols are classified according to their chemical structure. Specific isolation methods for selected compounds are given.