



Pedagogická
fakulta
Faculty
of Education

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Pedagogická fakulta

Katedra aplikované chemie

Diplomová práce

Antioxidační parametry modelového výrobku z ovoce

Vypracovala: Bc. Lenka Kratochvílová

Vedoucí práce: doc. Ing. Eva Dadáková, Ph.D.

České Budějovice 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci na téma antioxidační parametry modelového výrobku z ovoce jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě, elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne:.....

Bc. Lenka Kratochvílová

Abstrakt

Obsah hlavních komponent (anthokyanů, kvercetin, chlorogenové kyseliny, L-askorbové kyseliny, rutinu, celkových polyfenolů) byl zjišťován v sirupu z plodů bezu černého (*Sambucus nigra L.*) pomocí spektrofotometrie, nebo vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Dále byla zjišťována antioxidační aktivita tohoto sirupu pomocí tří metod: ABTS, FRAP, DPPH. Výsledky měření byly statisticky zpracovány a porovnávány pomocí korelační analýzy, konkrétně pomocí Pearsonova korelačního koeficientu.

Bylo zjištěno, že připravený výrobek obsahuje 2160 mg/kg anthokyanů, 201 mg/kg rutinu, 26 mg/kg chlorogenové kyseliny a 679 mg/l celkových polyfenolů. Volný kvercetin nebyl nalezen. Obsah L-askorbové kyseliny v původních bezinkách byl poměrně nízký a z tohoto důvodu byl sirup pro studijní účely obohacen touto látkou v množství 0,5% (m/m), aby bylo možno studovat souvislosti jeho obsahu s ostatními látkami.

Ze statistického zpracování je zřejmé, že koncentrace chlorogenové kyseliny koreluje s antioxidační aktivitou měřenou pomocí metody FRAP a koncentrace celkových polyfenolů s antioxidační aktivitou měřenou pomocí metody DPPH.

Klíčová slova: anthokyan; fenolické látky; rutin; kvercetin; chlorogenová kyselina; L-askorbová kyselina; spektrofotometrie; vysokoúčinná kapalinová chromatografie; ABTS; FRAP; DPPH; antioxidační aktivita; bez černý (*Sambucus nigra L.*)

Abstract

The content of the main components (anthocyanins, quercetin, chlorogenic acid, L-ascorbic acid, rutin, total polyphenols) was determined in the syrup of elderberries (*Sambucus nigra* L.) by spectrophotometry or high-performance liquid chromatography. Furthermore, the antioxidant activity of this syrup was determined using three methods: ABTS, FRAP, and DPPH. The measurement results were statistically processed and compared using correlation analysis, specifically using the Pearson correlation coefficient.

It was found that the prepared product contains 2160 mg/kg anthocyanins, 201 mg/kg rutin, 26 mg/kg chlorogenic acid and 679 mg/l polyphenols. No free quercetin was found. The content of L-ascorbic acid in the original elderberries was relatively low and therefore for study purposes, the syrup was enriched with this substance in the amount of 0.5% (w/w) to study the connection of its content with other substances.

It is clear from the statistical processing that the concentration of chlorogenic acid correlates with the antioxidant activity measured by the FRAP method and the concentration of polyphenols to the antioxidant activity measured by the DPPH method.

Keywords: anthocyanins; polyphenols; rutin; quercetin; chlorogenic acid; L-ascorbic acid; spectrophotometry; high-performance liquid chromatography; ABTS; FRAP; DPPH; antioxidant activity; elderberry (*Sambucus nigra* L.)

Poděkování

Děkuji paní doc. Ing. Evě Dadákové, Ph.D. za odbornou pomoc, cenné rady a trpělivost.

Také děkuji paní Ing. Tamaře Pelikánové a paní doc. Ing. Veronice Bártové, Ph.D. za pomoc v laboratoři při zpracovávání analýzy.

Velmi si vážím času, který mi poskytly při vypracovávání této diplomové práce.

Obsah

1	Úvod.....	10
2	Cíle práce	11
3	Literární rešerše	12
3.1	Bez černý (<i>Sambucus nigra</i> L.).....	12
3.1.1	Květy bezu černého.....	12
3.1.2	Bezinky	13
3.2	Vlastnosti obsahových látek	14
3.2.1	Anthokyany	14
3.2.2	Polyfenoly	15
3.2.3	Rutin.....	18
3.2.4	Kvercetin	20
3.2.5	Chlorogenová kyselina.....	22
3.3	Využívané metody.....	24
3.3.1	HPLC	24
3.3.2	Spektrofotometrie.....	25
3.4	Metody stanovující antioxidační parametry	26
3.4.1	Metoda DPPH	26
3.4.2	Metoda FRAP	26
3.4.3	Metoda ABTS	27
3.4.4	Stanovení celkových polyfenolů	27
4	Praktická část	28
4.1	Přístroje a pomůcky	28
4.2	Použité chemikálie	29
4.3	Použitý materiál.....	30
4.4	Příprava sirupu	30
4.5	Stanovení celkových anthokyanů	30

4.6	Stanovení L-askorbové kyseliny	32
4.7	Stanovení celkových polyfenolů	33
4.8	Stanovení obsahu rutinu, kvercetinu a chlorogenové kyseliny	33
4.9	Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH	36
4.10	Stanovení antioxidační aktivity metodou FRAP	37
4.11	Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS	37
5	Výsledky a diskuze	39
5.1	Obsah celkových anthokyanů v modelovém vzorku	39
5.2	Obsah L-askorbové kyseliny v modelovém vzorku	42
5.3	Obsah celkových polyfenolů v modelovém vzorku	44
5.4	Obsah rutinu v modelovém vzorku	47
5.5	Obsah kvercetinu v modelovém vzorku	48
5.6	Obsah chlorogenové kyseliny v modelovém vzorku	49
5.7	Antioxidační aktivita naměřena pomocí DPPH	50
5.8	Antioxidační aktivita naměřena pomocí FRAP	53
5.9	Antioxidační aktivita naměřena pomocí ABTS	56
5.10	Souhrnné porovnání	59
6	Statistické zpracování	60
6.1	Závislost FRAP na anthokyanech	61
6.2	Závislost DPPH na anthokyanech	62
6.3	Závislost ABTS na anthokyanech	63
6.4	Závislost FRAP na L-askorbové kyselině	64
6.5	Závislost FRAP na chlorogenové kyselině	65
6.6	Závislost FRAP na rutinu	66
6.7	Závislost L-askorbové kyseliny na DPPH	67
6.8	Závislost L-askorbové kyseliny na ABTS	68
6.9	Závislost chlorogenové kyseliny na DPPH	69

6.10	Závislost chlorogenové kyseliny na ABTS	70
6.11	Závislost rutinu na DPPH.....	71
6.12	Závislost rutinu na ABTS.....	72
6.13	Závislost FRAP na TPP.....	73
6.14	závislost DPPH na TPP	74
6.15	závislost ABTS na TPP	75
6.16	Souhrnná statistika	76
7	Závěr	77
8	Seznam literatury	78
9	Seznam obrázků.....	83
10	Sezam tabulek	86

Seznam použitých zkratk

ABTS – 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina

ABTS^{•+} - Radikál kationtu ABTS

Da – Unifikovaná atomová hmotnostní jednotka dalton

DPPH – 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl

FRAP - Ferric reducing antioxidant power, antioxidační parametr hodnotící sílu redukovat Fe³⁺

pH – Záporný dekadický logaritmus číselné hodnoty koncentrace vodíkových iontů v roztoku (power of hydrogen)

UV - Ultrafialové spektrum (Ultraviolet)

PBS – Fosfátový pufr (roztok dihydrogenfosforečnanu draselného a 5mM roztok dihydrogenfosforečnanu sodného)

1 Úvod

Diplomovou práci jsem rozdělila na dvě části. Nejprve jsem vytvořila literární rešerši. Tato část se skládá z charakteristiky bezu černého (*Sambucus nigra L.*) a látek v něm obsažených, vlastností obsahových látek a charakteristik využívaných metod. V praktické části se věnuji jednotlivým měřením a statistickému zpracování naměřených dat.

V praktické části se zaměřuji na analýzu hlavních komponentů v sirupu z plodů bezu černého (bezinek). Mezi hlavní komponenty řadím: anthokyany, celkové polyfenoly, chlorogenovou kyselinu, rutin, celkový kvercetin a L-askorbovou kyselinu. Dále zjišťuji antioxidační aktivitu sirupu. Při stanovení antioxidační aktivity využívám tři odlišné metody: ABTS, DPPH, FRAP.

Stanovení jsem prováděla pomocí spektrofotometrického měření, nebo pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Výsledky měření jsem přepočítala na obsah miligramů v kilogramu modelového vzorku z bezinek.

Poté co jsem dokončila práci v laboratoři a vyhodnotila měření, začala jsem se věnovat statistické části. Tuto část diplomové práce jsem zpracovala ve statistickém programu Statistica. Ke zpracování výsledků jsem použila korelační analýzu, konkrétně Pearsonův korelační koeficient, který měří velikost závislosti mezi dvěma veličinami. V práci jsem porovnávala obsah hlavních komponentů s jednotlivými metodami měření antioxidační aktivity.

2 Cíle práce

Cílem této diplomové práce bylo stanovit obsahy důležitých látek a antioxidační parametry v modelovém výrobku, což je ovocný sirup vyrobený z plodů černého bezu. Následně zjistit statistické souvislosti mezi obsahy důležitých látek a antioxidačními parametry. Diplomová práce byla vypracována jako součást projektu GAJU 028/2019/Z – Genetika, zdraví zvířat a biologicky a senzory aktivní látky jako základní předpoklad kvalitních potravin a zemědělských surovin.

3 Literární rešerše

3.1 Bez černý (*Sambucus nigra* L.)

Jedná se o keř, který je velmi rozrostlý a ve většině případů nepřesahuje výšku 6 metrů. Charakteristická barva kůry je světle šedá až hnědá. Kůra je svisle rozpraskaná. Uprostřed větviček se nachází bílá dřev. Na větvích jsou lichozpeřené listy. Jejich tvar je podlouhlý. Okraje listů jsou nepravidelně zubaté. Keř kvete v období jara, konkrétně od května do června, drobnými pětičetnými květy žlutobílého zbarvení, které tvoří ploché rozsáhlé vrcholíky o průměru 10 až 25 cm. Květ bezu černého je charakteristický intenzivním aromatem. Plody bezu černého se nazývají bezinky (Kubát, 2002).

Bez černý se hojně vyskytuje na dvou kontinentech, konkrétně v Přední Asii a v celé Evropě. V Evropě se s ním setkáme nejčastěji u plotů, na zříceninách, v křovinách, ve smíšených lesích, na rumišťích a v hájích (Korbelář a kol., 1973). Keř se rozsévá samovolně, ale zároveň jsou vysazovány i kulturní odrůdy do parků, popřípadě sadů. Šlechtěné odrůdy dorůstají nižšího vzrůstu a mají různě zbarvené listy (Slavík a kol., 1997; Kubát, 2002).

3.1.1 Květy bezu černého

Ke konzumaci a jinému použití se využívá květ, a to se stopkami i bez stopek, nebo zralé tepelně upravené plody (Korbelář a kol., 1973).

Květ před sběrem musí být suchý a neúplně rozvinutý. Po sběru se následně pověsí ve svazcích na provázky, nebo se pokládá na suchý papír. Květy je nutno chránit před vlhkostí, zároveň musí sušení probíhat dostatečně rychle. To z toho důvodu, aby nedocházelo ke změnám zbarvení květů, konkrétně hnědnutí. Suché květy se poté odrhnou na sítěch. Prosévání se opakuje, čímž dochází k odstraňování nežádoucích příměsí. Po odrhnutí se nechává dosušit na stinném a zároveň teplém místě, které nepřesahuje teplotu 35 °C, což platí i pro sušení v sušičkách. Plody se sbírají plně zralé nejčastěji v průběhu září. Vrcholíky se suší na přímém slunci, až do té doby, než se bobule scvrknou (Korbelář a kol., 1973).

Květy bezu černého obsahují velké množství biologicky významných látek, mezi které patří: silice, rutin, cholin, glykosid sambunigrin, třísloviny a řada dalších podobných látek (Korbelář a kol., 1973).

3.1.2 Bezinky

Bezinky jsou plody bezu černého, které se sklízí v podzimních měsících, kdy dozrávají. Zralé plody mají kulatý tvar velký 5 až 8 milimetrů. Jejich barva je fialová až černofialová. Plody jsou lesklé. V každém plodu se nachází 3 pecky (Grau a kol., 1996).

Plody bezu černého se využívají již mnoho let v Evropě v potravinářském průmyslu. Z bezinek se vyrábí marmelády, džemy, zmrzliny, jogurty, alkoholické nápoje a mnoho dalších. Před konzumací bezinek je nutná jejich tepelná úprava. Bez tepelné úpravy bezinky způsobují zažívací problémy spojené se závratěmi (Domínguez a kol., 2020; Grau a kol., 1996).

Dále se využívají v domácím léčitelství. Bezinky mají antioxidační, antikarcinogenní, imunní, antialergické, antivirové a antibakteriální vlastnosti. Nejhojněji se bezinky využívají hlavně z důvodu antioxidačních schopností. Díky této schopnosti se bezinky využívají jako doplňky stravy. Napomáhají lidem vypořádat se s oxidačním stresem, při kterém reaktivní druhy kyslíku poškozují biomakromolekuly, aminokyseliny, DNA, lipidy a bílkoviny. Léčivé účinky bezinek jsou způsobeny vysokým obsahem polyfenolických sloučenin (Domínguez a kol., 2020). Využívají se k léčení chřipky, konkrétně sráží teplotu, podporují léčbu rýmy, kašle a dýchacích cest (Veberic a kol., 2009).

Mezi významné polyfenolické sloučeniny bezu černého zařazujeme flavonoidy (kvercetin-3-rutinosid, kvercetin-3-glukosid) a anthokyany (kyanidin-3-glukosid, kyanidin-3-sambubiosid-5-glukosid, kyanidin-3,5-diglukosid, kyanidin-3-sambubiosid). Všechny zmíněné sloučeniny jsou obecně označovány jako pohlcovače radikálů, které jsou schopny chránit lidské tělo před oxidačním stresem a peroxidací lipidů (Domínguez a kol., 2020; Veberic a kol., 2009).

Mimo tyto látky obsahují bezinky cukry (fruktózu, glukózu) a organické kyseliny (citrónovou, šikimovou, fumarovou) (Domínguez a kol., 2020; Veberic a kol., 2009). Jsou dobrým zdrojem vitamínu B, minerálních látek například: vápníku, draslíku, železa, mědi, zinku, fosforu, sodíku a dalších. Dále obsahují bílkoviny.

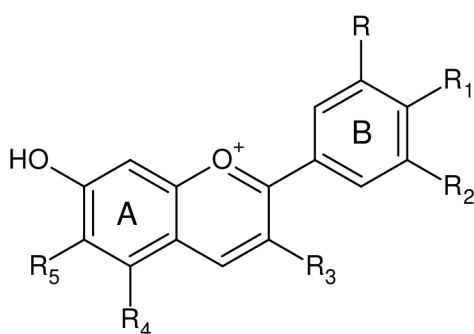
Bílkoviny jsou složeny z aminokyselin. Konkrétně z alaninu, asparagové kyseliny, glutamové kyseliny, leucinu a dalších méně zastoupených (Vulic a kol., 2008).

3.2 Vlastnosti obsahových látek

3.2.1 Anthokyany

Mezi anthokyany patří velké množství sloučenin, které se stanovují jako suma, a to z důvodu jejich chemické, fyzikální i biologické podobnosti. Anthokyany tvoří podskupinu flavonoidů. Konkrétně se jedná o glykosidy fenolického aglykonu anthokyanu vázaného na molekulu sacharidu. Chemická struktura anthokyanů je tvořena dvěma benzenovými kruhy, které jsou spojeny řetězcem tří uhlíků. Tato struktura je znázorněna na obrázku 1. Na pozicích R až R₅ mohou být navázány sacharidy. Mezi nejčastěji navázané sacharidy patří D-xylosa, L-arabiosa, D-galaktosa, G-glukosa, L-rhammosa (Velíšek a Hajšlová, 2009).

Obrázek 1: Základní struktura anthokyanů (Velíšek a Hajšlová, 2009)



Anthokyany jsou rozmanitě rozšířeny po celé rostlinné říši. Způsobují červené nebo fialové zbarvení bobulí, ovoce a zeleniny. Od flavonoidů se odlišují tím, že jsou v potravě zastoupeny ve vyšších koncentracích. Důležitou vlastností anthokyanů je preventivní účinek proti rakovině. Studie prokázaly, že zvýšená konzumace anthokyanů slouží jako prevence proti rakovině prsu a snížení rizika srdečních chorob. Dále mají anthokyany pozitivní účinek na nervový systém a další (Cooke, a kol., 2005).

Anthokyany jsou velmi dobře rozpustné ve vodě a vyskytují se v různých konformacích, které jsou závislé na pH prostředí. Jednotlivé konformace se odlišují

různým zbarvením (červené, fialové, modré nebo i oranžové), nebo různou intenzitou zmíněných barev (Cooke, a kol., 2005).

3.2.2 Polyfenoly

Mezi polyfenolické látky patří jednoduché fenoly, fenolové kyseliny (deriváty benzoové a skořicové kyseliny) dále kumariny, flavonoidy, stilbeny, hydrolyzované a kondenzované taniny, lignany a ligniny. Tyto sloučeniny patří mezi nejrozšířenější sekundární metabolity rostlin. Přispívají například k pigmentaci rostlin, mají antioxidační vlastnosti a ochranné schopnosti proti záření UV (Blainski a kol., 2013).

Potraviny bohaté na polyfenoly jsou bobulové plody (černý rybíz, borůvky, ostružiny), jablka, hroznové víno, káva, ze zeleniny např. cibule, mrkev, artyčoky. Polyfenoly patří mezi nejrozšířenější a nejstudovanější skupinu rostlinných sekundárních polyfenolů vzhledem k velkému množství jejich zdraví prospěšných účinků (Scarano a kol., 2020).

Biologické vlastnosti polyfenolů zahrnují protirakovinné, antioxidační a protizánětlivé účinky. Dále také mají antimikrobiální vlastnosti. Jsou pro lidi velmi důležitým zdrojem protivirových látek (Watson a kol., 2014).

Vlastnosti polyfenolů:

- Omezeně rozpustné ve vodě
- Jejich molekulová hmotnost je od 500 do 4000 Da
- Většina polyfenolů má 5 až 7 aromatických jader v 1000 Da (Abdel-Shafy a kol., 2017).

Polyfenoly jsou molekuly, které dobře absorbují záření UV oblasti. Tuto schopnost mají díky své chemické struktuře. Konkrétně přítomnosti aromatických jader v molekule. Tyto jádra jsou charakteristické konjugovanými systémy π -elektronů. Mimo to mají také fluorescenční vlastnosti (Abdel-Shafy a kol., 2017).

Některé polyfenoly se využívají jako barviva. Například v Indii se při barvení látek z přírodních vláken využívá slupka, nebo šťáva z granátového jablka, která obsahuje vysoké množství tříslovin a jiných polyfenolů. K barvení a činění kůže se dříve velmi často využívaly rostlinné kůry (např. dubová) s vysokým obsahem polyfenolů. Dnes se polyfenoly stále využívají jako prekursory v chemii přírodních

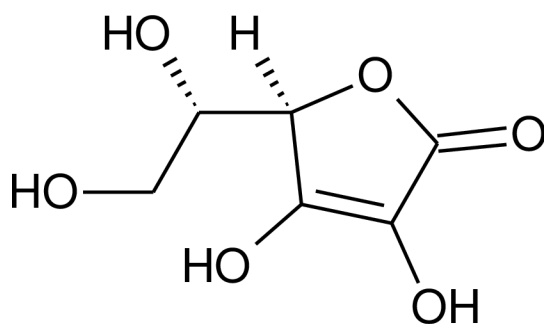
látek. Cílem takové chemie je využití zbytků z oliv, hroznů, pekanových ořechů a dalších, které zůstávají po zpracování jako odpad (Abdel-Shafy a kol., 2017).

Přírozená ochrana a konzervace dřeva proti hnilobě se také vysvětluje vysokou koncentrací polyfenolů v některých dřevinách. Polyfenoly se můžou vyskytovat i u zvířat (Shilpi, a kol., 2019).

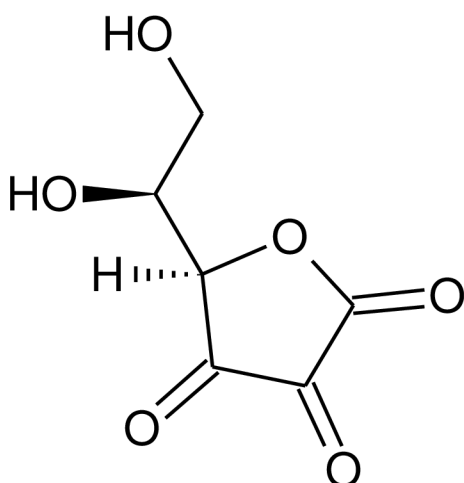
L-askorbová kyselina, neboli vitamín C, je látka s antioxidačními vlastnostmi a má uplatnění v řadě biologických procesů v lidském těle. Funguje jako kofaktor enzymu potřebného při syntéze kolagenu a dalších enzymů. Vitamín C má vlastnosti významné pro lidské tělo. Tyto vlastnosti jsou antibakteriální, antivirové, zvyšující imunitu, detoxikační a další. Má schopnost inhibovat množení rakovinných buněk. Protinádorové účinky vitamínu C jsou závislé na jeho koncentraci v lidském organismu (Shilpi, a kol., 2019).

Existují dvě chemické struktury L-askorbové kyseliny. Jedná se o redukovanou formu znázorněna na obrázku číslo 2 a oxidovaná forma znázorněna na obrázku číslo 3 (Shilpi, a kol., 2019).

Obrázek 2: Redukovaná forma L-askorbové kyseliny



Obrázek 3: Oxidovaná forma L-askorbové kyseliny



Redukovaná forma je převládající strukturou v lidském těle. L-askorbová kyselina je vynikající redukční činidlo, které po dvou následujících oxidacích tvoří radikál askorbátu. Radikál není reaktivní a nepokračuje v radikálové reakci. L-askorbová kyselina je syntetizovaná rostlinami a je nezbytnou živinou, fungující jako antioxidant, který se podílí na tvorbě nové tkáně. Funkce mnoha enzymů je závislá na vitamínu-C (L-askorbové kyselině) (Shilpi, a kol., 2019).

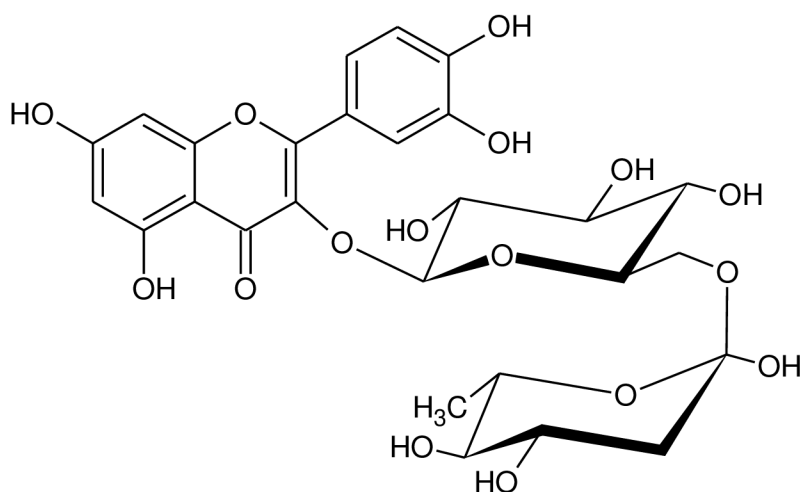
L-askorbová kyselina je ve vodě rozpustná sloučenina, charakteristická jako antioxidační enzymový kofaktor, přítomný v rostlinách a některých zvířatech. Na rozdíl od většiny savců lidé nedokáží tuto látku syntetizovat, a tak ji musí přijímat v potravě. L-askorbová kyselina je primární antioxidant, který zůstává v krevní plazmě. Výzkumy prokázaly, že tento antioxidant je schopen reagovat s kyslíkovými, hydroxylovými a superoxidovými radikály (Shilpi, a kol., 2019).

Biologické funkce L-askorbové kyseliny vychází z její schopnosti vystupovat jako účinný antioxidant. Díky redukční schopnosti redukuje fyziologicky reaktivní formy kyslíku. V kombinaci s protinádorovými léky zlepšuje imunitu, podporuje tvorbu tkání a má detoxikační účinky. Důležitou roli má také při tvorbě kolagenu. L-askorbová kyselina primárně funguje jako kofaktor enzymu katalyzujících vznik nativního kolagenu. Kolagen následně tvoří nepropustnou vrstvu pro nádory, ve kterých se nachází. Nádoru je zabráněno následnému metastázování (Shilpi, a kol., 2019).

3.2.3 Rutin

Rutin, jehož struktura je znázorněna na obrázku číslo 4, byl objeven ve Španělsku v 19. století. Tam se využíval v lékařství k léčbě cévních poruch, konkrétně při problémech s propustností a křehkostí kapilár. Je hojně obsažen v různých druzích ovoce i zeleniny. Vyskytovat se může v kůře, listech, květech, ale i kořenech, nebo dužině. Je syntetizován ve vyšších rostlinách, kde má ochranou funkci proti UV záření a chorobám. Nejbohatší potravina na rutin je pohanka. Obsah rutinu v pohance se mění v závislosti na druhu. Mimo druh se obsah rutinu v pohance liší i v různých částech rostliny. Největší koncentrace je ve slupkách semen. Nižší koncentraci nalezneme poté v zelených částech rostlin (Nabavi a Silva, 2019).

Obrázek 4: Chemická struktura rutinu



Tabulka 1: Obsah rutinu v daných rostlinách a jejich částech (Nabavi a Silva, 2019; Kalinová a Dadáková, 2013)

Rostlina	Slupka (mg / 100 g sušiny)	Stonky (mg / 100 g sušiny)	Semeno (mg / 100 g sušiny)	Listy (mg / 100 g sušiny)
Pohanka obecná	3,250	235	10	7175
Pohanka tatarská	Nebylo stanovováno	1637	1250	6425
Cibule kuchyňská	6	nebylo stanovováno	nebylo stanovováno	nebylo stanovováno
Rakytník	nebylo stanovováno	nebylo stanovováno	nebylo stanovováno	377
Chřest	nebylo stanovováno	670	nebylo stanovováno	nebylo stanovováno
Jablka	800	nebylo stanovováno	nebylo stanovováno	Nebylo stanovováno

Jedná se o glykosidovou formu kvercetinu. Podobně jako ostatní flavonoidy, má rutin díky své struktuře antioxidační vlastnosti související s příznivým vlivem na lidské zdraví. Rutin (kvercetin-3-O-rutinosid) je také známý jako vitamín P. Při hydrolýze rutinu dochází k uvolnění kvercetinu a rutinózy. Z toho důvodu se téměř vždy vyskytuje rutin společně s kvercetinem. Stejně jako ostatní flavonoidy, slouží i rutin jako přírodní pohlcovač volných radikálů. Rutin lze kvantitativně analyzovat pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie (Nabavi a Silva, 2019).

Rutin může reagovat s ostatními polyfenolickými sloučeninami, kovovými ionty hořečnatými, železitými, nebo kyslíkem. Těmto reakcím je nutné při práci s rutinem zamezit, aby se snižovalo riziko oxidace rutinu. Kopigmentační reakce rutinu s kyanidinem-3-diglukosid-5-glukosidem vede ke zvýšení antioxidačních účinků komplexů. V momentě, kdy se rutin dostane do tlustého střeva je metabolizován probiotiky. Tento proces vede k tvorbě metabolitů. Konkrétně

kvercetin a rutin, ty mají následně antioxidační a protizánětlivé účinky (Nabavi a Silva, 2019).

Nízká rozpustnost rutinu ve vodě způsobuje komplikace při začlenění rutinu do potravin a doplňků stravy. Výhodou rutinu je jeho poměrně dobrá stabilita ve šťávách díky kopigmentačním reakcím, protože komplexy jsou stabilní do 100 °C. Konkrétně u pohanky dochází při zahřívání na 150 °C ke zvýšení obsahu rutinu, zatímco při varu ve vodě k vysokým ztrátám této významné látky (Nabavi a Silva, 2019).

Výzkumy ukázaly, že se rutin může využívat k prevenci leukemie a osteoporózy. Podporuje tvorbu kostí. Je nejvíce studovaný flavonoid z důvodu účinků na neurologické poruchy a mozkové patologie. Konkrétně mozek je velmi citlivý na oxidační poškození a jeho nízké hladiny antioxidační ochrany přeměňují flavonoidy na potenciální farmakologické látky díky jejím antioxidačním vlastnostem. Neuroprotektivní účinek rutinu byl hodnocen pomocí výzkumů na zvířatech a na různých buňkách. Bylo prokázáno, že rutin může zabránit kognitivnímu poškození, neurozáněti a oxidačnímu stresu. Také bylo prokázáno potlačení subarachnoidálního krvácení, které vzniká při poranění mozku. Všechny výzkumy došly ke konkrétnímu závěru. Rutin slouží jako ochranná látka proti neurologickým poruchám (Nabavi a Silva, 2019).

Zvýšený příjem rutinu z pohanky, nebo funkčních potravin má dobrý vliv na prevenci proti různým nemocím. Lidé často vyřazují některé části rostlin, které jsou bohatým zdrojem rutinu z potravy. Tyto části by mohly sloužit jako zdroj rutinu pro výrobu extraktů, přísad, léků a doplňků stravy (Nabavi a Silva, 2019).

3.2.4 Kvercetin

Kvercetin je flavonoid patřící do skupiny flavonolů. Jedná se o světle žlutou látku, která se nachází přibližně v 80 % všech vyšších rostlinných květech, listech a dalších částí. Kvercetin se také vyskytuje jako O-glykosid v nejrůznějších potravinách, což je jeho nejběžnější forma. Většina vlastností kvercetinu pochází ze stavby molekuly 2-fenylchromen-4-onu. Všechny formy výskytu zahrnují kvercetinové glykosidy, ve kterých je kvercetin spojen s několika sacharidovými jednotkami, nejčastěji glukózou, nebo rutinózou. Největší množství kvercetinu je obsaženo v rajčatech, cibuli, paprikách, brusinkách, jablkách, hroznech a mnoha

dalších materiálech. Obsah kvercetinu závisí na podmínkách růstu konkrétní rostliny (Nabavi a Silva, 2019).

Tabulka 2: Obsah kvercetinu v rostlinách (Nabavi a Silva, 2019)

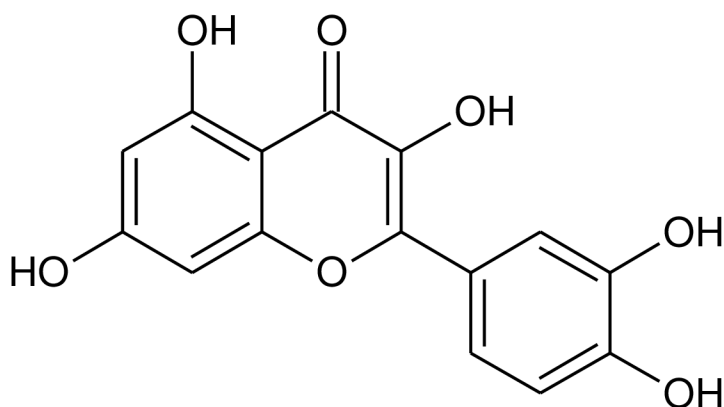
Potravina	Obsah kvercetinu (mg/100 g)
Kapary (bez tepelné úpravy)	233,84
Papriky (pálivé, žluté, bez tepelné úpravy)	50,73
Paprika (červená bez tepelné úpravy)	39,21
Chřest (vařený)	15,16
Brusinky (bez tepelné úpravy)	14,84
Papriky (pálivé, zelené, bez tepelné úpravy)	14,70
Borůvky	7,67
Salát (červené listy, bez tepelné úpravy)	7,61
Cibule (bílá, bez tepelné úpravy)	6,17
Rajčata (konzervovaná)	4,12
Jablka (s kůrou)	3,80
Vinná réva (bílé bobule)	0,04

Kvercetin má blahodárné účinky na lidské zdraví. Bylo prokázáno, že výživa bohatá na kvercetin má preventivní účinky proti rakovině a způsobuje snížení oxidačního poškození lymfocytového DNA. Podle výzkumů má kvercetin předcházející účinky rozkladu endotelu a zároveň ochrany myokard před ischemickým poškozením (Nabavi a Silva, 2019).

Byl studován vliv kvercetinu na obezitu. Při výzkumu, který se prováděl na myších bylo zjištěno, že kvercetin má blahodárný vliv na snižování hmotnosti. U pozorovaného vzorku došlo k poklesu hmotnosti bílého tuku v játrech a zároveň ke snížení hladiny cholesterolu. Kvercetin snižuje schopnost jater rozkládat cyklosporin. Jedná se o negativní vliv, při kterém dochází k potlačení účinku určitých léků (Nabavi a Silva, 2019).

Kvercetin má široký rozsah pozitivních účinků na fyzické i duševní zdraví, ale také má obrannou funkci v organismu (Nabavi a Silva, 2019).

Obrázek 5: Chemická struktura kvercetinu



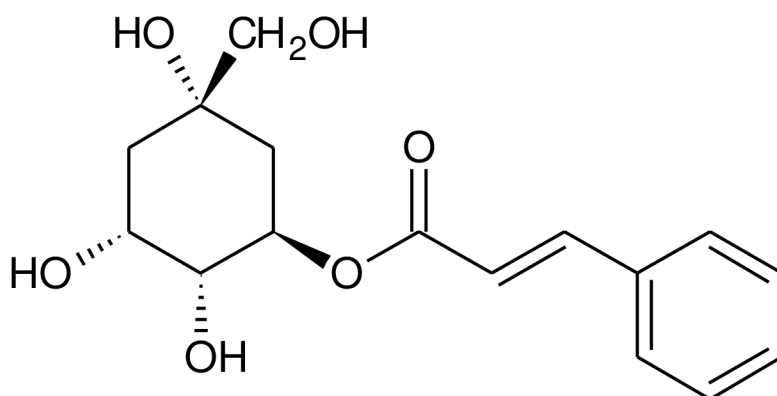
Chemická struktura kvercetinu, která je znázorněna na obrázku číslo 5, má zásadní vliv na jeho antioxidační vlastnosti. Kvercetin má navázanou hydroxylovou skupinu na třetím uhlíku, dvojnou vazbu mezi druhým a třetím uhlíkem, karbonylovou skupinu na uhlíku čtvrtém a polyhydroxylovaná a aromatická jádra (Ozgen a kol., 2016).

Kvercetin je jednou z přírodních flavonoidních látek nejčastěji se vyskytující jako sekundární metabolit ve vyšších rostlinách. Výroba syntetického kvercetinu zatím nebyla praktikována, proto jsou rostliny jediným zdrojem kvercetinu. Bylo testováno velké množství zeleniny a ovoce a nejbohatší zeleninou na kvercetin je jednoznačně cibule. Kvercetin má antikarcinogenní a protizánětlivé vlastnosti, pohlcuje volné radikály (Ozgen a kol., 2016)

3.2.5 Chlorogenová kyselina

Chlorogenová kyselina, jejíž struktura je znázorněna na obrázku číslo 6, je přirozeně se vyskytující sloučenina ze skupiny fenolických kyselin, která se vyskytuje v různých rostlinách. V současné době je velmi významná z důvodu příznivých zdravotních účinků. Výzkumy dokázaly, že je účinná proti obezitě a jako prevence rakoviny. Z chemického hlediska tvoří chlorogenová kyselina skupinu esterů, které jsou vytvořeny chinonovou kyselinu společně s jedním, nebo více deriváty trans-hydroxyskořicové kyseliny (Gil a Wianowska, 2017).

Obrázek 6: Chemická struktura chlorogenové kyseliny



Hlavní vlastností chlorogenové kyseliny je chemická nestabilita a degradace na jiné sloučeniny, včetně jiných izomerů. K degradaci může docházet při zahřívání kyseliny ve vodě, při hydrolýze, esterifikaci, ale například i při izolaci chlorogenové kyseliny z rostlinných materiálů. Z tohoto důvodu se dnes hledají možnosti, jak vyextrahovat chlorogenovou kyselinu bez degradace na jiné látky, aby docházelo k extrakci s vysokým výtěžkem chlorogenové kyseliny (Gil a Wianowska, 2017).

Chlorogenová kyselina patří k běžným složkám rostlin. Je přítomna například v jablkách, broskvích, nektarinkách, švestkách, liči, mangu, třešních, borůvkách, černém rybízu, ostružinách, bezinkách, zeli, kapustě, celeru, mrkvi, kmínu, koriandru a řadě dalších. Je obsažena ve všech částech rostlin (semena, kořeny, hlízy, listy, květy). Také ve všech výrobcích vyrobených z těchto surovin, hlavně v nápojích (káva, černý, zelený čaj, džus, šťáva, víno). Obsah chlorogenové kyseliny v rostlině je závislý na částech rostlin, ale také na fyziologickém stádiu rostliny, skladování a zpracování, největší rozdíly jsou u tepelně zpracovaných rostlin. Jedním z nejbohatších dietních zdrojů chlorogenové kyseliny je káva (Gil a Wianowska, 2017).

První zmínka o chlorogenové kyselině pochází z 19. století. Tuto kyselinu objevili v kávových zrnech. Následně byla zkoumána chemická struktura chlorogenové kyseliny a byl navržen empirický vzorec. Chlorogenová kyselina, tak jak ji známe v dnešní podobě, byla představena začátkem 20. století (Gil a Wianowska, 2017).

Chlorogenová kyselina má blahodárné účinky na lidské zdraví. Jedná se o hepatoprotektivní a choleretické účinky, antioxidační, antivirové, antibakteriální, protirakovinné a protizánětlivé vlastnosti. Také snižuje riziko kardiovaskulárních

nemocí a snižuje relativní rizika cukrovky typu dva a Alzheimerovy choroby. Některé z těchto vlastností jsou již dlouhou dobu testovány, jiné zatím nejsou potvrzeny a jsou detailně zkoumány. Mezi zkoumané patří například vliv chlorogenové kyseliny na obezitu a metabolismus glukózy, nebo zamezení replikace HIV (Gil a Wianowska, 2017).

3.3 Využívané metody

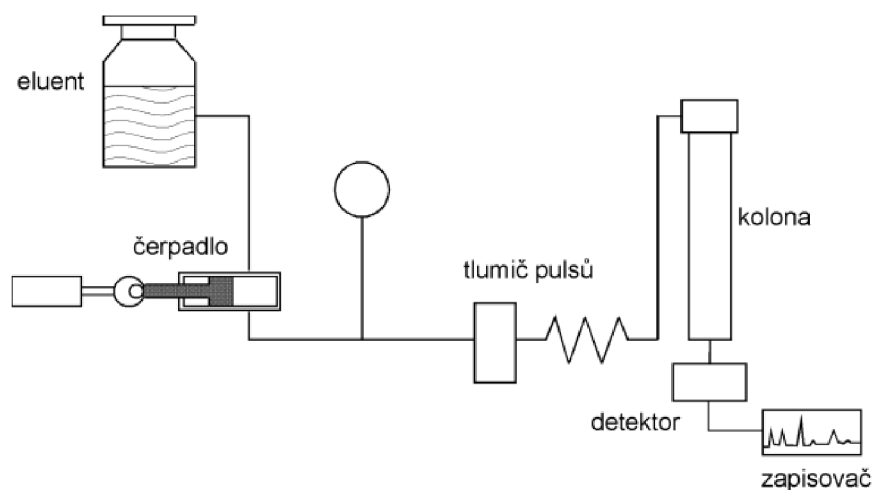
3.3.1 HPLC

HPLC, neboli vysokoúčinná kapalinová chromatografie, je dnes hojně využívanou analytickou metodou, která má univerzální použití pro kvalitativní i kvantitativní analýzu velkého množství látek. Tato metoda dokáže identifikovat látky anorganického i organického původu (Křížek a Šíma, 2015). Mimo neutrální sloučeniny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie můžeme stanovovat velké množství sloučenin, jako jsou nabitě sloučeniny, polymerní látky, tepelně nestabilní sloučeniny, omezeně těkavé, nízkomolekulární, nepolární i polární látky (Štulík a kol., 2005)

Chromatografie využívá různé pohyblivé fáze. Podle využití pohyblivé fáze se rozlišuje plazmová, fluidní, plynová a kapalinová chromatografie. Při chromatografii dochází k dělení vzorku mezi pohyblivou a nepohyblivou fází. Pohyblivá fáze se také označuje jako fáze mobilní. Pro nepohyblivou fází se používá označení stacionární. Při HPLC dochází nejprve k naplnění kolony stacionární fází, kterou následně prochází mobilní fáze. Mobilní fáze prochází různou rychlostí. K dělení složek vzorku dochází podle interakcí mezi oběma fázemi.

Další dělení HPLC je založeno podle druhu interakce na rozdělovací, gelovou, iontově výměnnou a absorpční chromatografii. Nejprve se vzorek pomocí nástřiku aplikuje do kolony chromatografie. Následně konkrétní složky vzorku putují s mobilní fází různými rychlostmi v koloně, která je předem naplněna stacionární fází. Jednotlivé složky opouští kolonu přes detektor, který deteguje jaké sloučeniny a v jakém množství jsou ve vzorku obsaženy a interpretuje je pomocí tzv. píků. Množství sloučenin obsažených ve vzorku je totožný s počtem píků po dokončení detekce (Křížek a Šíma, 2015).

Obrázek 7: Schéma kapalinového chromatografu (Křížek a Šíma 2015)



3.3.2 Spektrofotometrie

Spektrofotometrie se řadí mezi jednoduché, nenáročné a rychlé analytické metody. Za nevýhody je považována menší citlivost metody oproti HPLC metodě. Při spektrofotometrii dochází k interakci mezi vzorkem a monochromatickým záření a jeho absorpci. Při měření se získávají informace o složení vzorku, popřípadě o určité koncentraci stanovované látky ve vzorku. Spektrofotometrické metody se dělí podle výsledného měření na tři kapitoly:

- Emisní spektrofotometrie
- Luminiscenční spektrofotometrie
- Absorpční spektrofotometrie

U luminiscenční a emisní spektrofotometrie analyzovaný vzorek pohlcuje záření, čímž se analyzovaný vzorek dostává do excitovaného stavu. Při přechodu vzorku z excitovaného stavu do základního vyzařuje analyzovaný vzorek záření. Toto záření je měřeno. Naopak u absorpční spektrofotometrie se zaznamenává elektromagnetické záření, které je pohlcováno. Výsledné měření je zaznamenáno pomocí grafického znázornění, kde je vyjádřena závislost toku na frekvenci, nebo závislost toku na vlnové délce (Skoog a kol., 2019; Křížek a Šíma, 2015).

Při spektrofotometrii lze získat výsledky, které poskytují informaci o kvantitativním i kvalitativním složení zkoumaného vzorku. (Křížek a Šíma, 2015).

Tato metoda se využívá v různých oblastech (biochemie, biologie, potravinářský průmysl, zemědělský průmysl). Metoda vychází z Lambert-Bertova zákona, který říká, že množství pohlceného záření závisí na koncentraci sledované látky ve vzorku. Při pohlcení monochromatického záření dochází k poklesu světelného proudu, který vychází ze zdroje. Pokles světelného toku je závislý na koncentraci daného vzorku. (Skoog a kol., 2019).

3.4 Metody stanovující antioxidační parametry

Tyto metody hodnotí, do jaké míry je schopna zkoumaná látka na sebe vázat volné radikály. Metodou se stanoví všechny látky přítomné ve vzorku, které jsou schopny s daným činidlem reagovat za podmínek metody. Volné radikály jsou buďto kyslíkové (hydroxyl, peroxyd), nebo složité organické radikály (DPPH, ABTS⁺). Do reakční směsi jsou radikály přidávány, nebo je jejich obsah v průběhu analýzy generován. Metody využívají výrazné barevné změny činidla po reakci k fotometrickému vyhodnocení. Výsledek je vyjadřován jako ekvivalent L-askorbové, nebo gallové kyseliny na jednotku vzorku (Paulová a kol., 2004).

3.4.1 Metoda DPPH

Tato metoda využívá stabilní volný radikál 1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl. Jedná se o sloučeninu, která vykazuje silně absorpční vlastnosti při 517 nm v etanolu. Zároveň pH musí být udržováno při hodnotách 5 - 6,5. Pro udržení pH se doporučuje využívat acetátové pufrů. Při reakci dochází k oxidaci 1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazinu, který se redukuje na DPPH-H (difenylpikrylhydrazin). Reakci doprovází barevná změna, při které dochází k odbarvení původní fialové látky.

Reakce se vyhodnocuje spektrofotometricky, kde se měří pokles absorbance při 517 nm. Taktéž se může využít HPLC (Paulová a kol., 2004).

3.4.2 Metoda FRAP

Tato metoda je založena na charakteristické redukční schopnosti antioxidantů. Antioxidanty patří mezi redukční činidla, to znamená, že reagují s látkami, které

podléhají redukci. Tyto látky jsou při redukci inaktivovány. Díky tomu lze měřit antioxidační aktivitu v závislosti na ochotnosti látky redukovat (Paulová a kol., 2004).

Při metodě FRAP dochází k redukci pomocí antioxidantů železitého komplexu na komplex železnatý. V průběhu reakce také dochází k růstu absorbance. Absorbance se měří při vlnové délce 593 nm. Růst absorbance je totožný s mírou antioxidační aktivity. Při této metodě je nutné dodržovat stabilní pH na hodnotě 3,6 (Paulová a kol., 2004).

3.4.3 Metoda ABTS

Tato metoda se nejčastěji využívá pro stanovení celkové antioxidační aktivity. Měří se schopnost látky, popřípadě zkoumaného vzorku, pohlcovat kation radikálu ABTS^{•+} (2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)). Pohlcování radikálů se měří pomocí spektrofotometru nejčastěji při absorbanci 734 nm. Metoda ABTS má široké spektrum uplatnění pro měření celkové antioxidační aktivity (Paulová a kol., 2004).

3.4.4 Stanovení celkových polyfenolů

Komplexní stanovení polyfenolů komplikuje strukturní rozmanitost a složitost jednotlivých skupin. Jako nejvhodnější metoda je společná reakce s činidlem a spektrofotometrie (Blainski a kol., 2013).

Ke stanovení se využívá kolorimetrické reakce. Při těchto reakcích reagují rostlinné polyfenoly se specifickými redoxními činidly. Konkrétně Folin-Ciocalteuovo činidlo, za vzniku modrého komplexu (chromofor), který lze kvantifikovat spektrofotometricky. Chromofor je tvořen fosfowolframovým komplexem fosfomolybdenu, kde maximální absorbance závisí na koncentraci fenolických sloučenin v zásaditém roztoku. Vzhledem k tomu, že se Folin-Ciocalteuovo činidlo velmi rychle rozkládá v zásaditých roztocích, musí se použít velký přebytek činidla k dosažení úplné reakce (Blainski a kol., 2013).

4 Praktická část

4.1 Přístroje a pomůcky

Analytické váhy AB 204 (Mettler Toledo, Švýcarsko)

Automatické pipety, objem 20-200 μl a 100-1000 μl Transferpette (Treff AG, Švýcarsko)

Kapalinový chromatograf Agilent 1200 Series Rapid Resolution LC System (Agilent Technologies, USA), detektor DAD UV/VIS (Agilent Technologies, USA)

Kolona Zorbax SB-C8 (4,6 x 150 mm, zrnitost částic stacionární fáze 5 μm) (Agilent Technologies, USA) SB C18 (4,6 x 50 mm, zrnitost částic stacionární fáze 1,8 μm)

Kombinovaná lednička s chladničkou (Bosch Cooler, Německo)

Magnetické míchadlo (Heidolph, Německo)

Nerezový ocelový hrnec

Oasis SPE kolonky (Water, USA)

Odstředivka Sigma 2-5 (Sigma Laborzentrifugen, Německo)

pH – metr Inolab-1, s elektrodou SenTix 61 (WTW Německo)

Plastové květy

Skleněné vialky 1,8 ml

Skleněné pipety

Sada laboratorního skla (Fisher Scientific, Pardubice, ČR)

Sada zavařovacích sklenic

Silonová tkanina

Sítko

Skleněné filtrační zařízení (Sigma Aldrich)

SPE kolonky RP-18 (Merck, Německo)

Spektrofotometr Biochrom WPA Lightwave II UV/Visible (WPA Biochrom, UK)

Spektrofotometr Thermo electron corporation BioMate 5 (Thermo Fisher Scientific, USA)

Teplovzdušná sušárna ULM (Memmert, Německo)

Třepačka LT2, (Kavalier Sázava, ČR)

Tyčový mixér (Bosch, Německo)

Varná indukční deska

Vařečky

Vysokorychlostní třepačka Vortex Genie 2 Scientific Industries (IKA-Werke, Německo)

Zkumavky s víčkem a teflonovým těsněním

4.2 Použité chemikálie

2 - naftyloctová kyselina (25 g – Roth-Czech s.r.o., ČR)

2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl – (100 mg - Sigma-Aldrich, USA)

2,4,6- Tris(2-pyridyl)-s-triazine (10 g – Sigma-Aldrich, USA)

ABTS – (100 ml - Sigma Aldrich, USA)

Acetátový pufr Ph = 3,6 (1000 ml – Honeywell, ČR)

Acetonitril (100 ml - PENTA s.r.o., ČR)

Citronová kyselina (1000 g – Lach:ner, ČR)

Destilovaná voda (ZF JČU, ČR), připravovaná na zařízení firmy Premier (USA)

Dihydrogenfosforečnan draselný (1000 g – Lach:ner, ČR)

Dihydrogenfosforečnan sodný (1000 g – PENTA s.r.o., ČR)

EDTA (1000 g – Sigma-Aldrich, USA)

Folin-Ciocalteu činidlo vodný roztok (1000 ml PENTA s.r.o., ČR)

Chelaton III (500 g – Lachema, ČR)

Chlorid železitý bezvodý (100 g - PENTA s.r.o., ČR)

Kyselina chlorovodíková (1N - 1000 ml - PENTA s.r.o., ČR)

L-askorbová kyselina (1000 g – Lach:ner, ČR)

Methanol (M=0,1 – PENTA s.r.o., ČR)

Mravenčí kyselina 85% (1000 ml – PENTA s.r.o., ČR)

Oxid manganičitý - (500 g - Sigma-Aldrich, USA)

Pitná voda

Sacharóza (cukr krystal korunní, ČR)

Šťavelová kyselina dihydrát – (1000 g - PENTA s.r.o., ČR)

Uhličitan sodný bezvodý p.a.(1000 g - PENTA s.r.o., ČR)

4.3 Použitý materiál

V praktické části diplomové práce byly použity bezinky – plody bezu černého, jako modelový biologický materiál. Bezinky byly nasbírány na volně rostoucích keřích bezu černého na podzim roku 2018. Tyto plody byly nasbírány v lokalitě Lhenicko (49.0365689 N, 14.1072628 E). Po sběru byly odděleny čisté bobule, které byly zmrazeny a uchovány ve zmrzlém stavu -16 °C. Ve zmrzlém stavu byly uchovány až do zimy 2021, kdy probíhalo zpracování bezinek nejprve do formy modelového výrobku - sirupu a v něm probíhalo následné stanovení důležitých obsahových látek

4.4 Příprava sirupu

Pro stanovení všech látek byl použit sirup, který byl uvařen z plodů bezu černého. Tento sirup budeme nazývat jako modelový vzorek. Nejprve bylo naváženo přibližně asi 1 kg zmrzlého biologického materiálu, který se nechal rozmraznout. Po rozmrazení byl biologický materiál homogenizován po dobu 5 minut pomocí tyčového mixéru. Zhomogenizovaný materiál byl pomocí silonové tkaniny a sítka prolisován. Z vylisované šťávy bylo odebráno 800 g pro výrobu sirupu. Sirup byl obohacen přídatkem vitamínu C, protože z předchozích analýz je známo, že bezinky mají jen malý obsah L-askorbové kyseliny (Kratochvílová, 2020).

Sirup byl uvařen z 800 g vylisované šťávy, 800 g sacharózy, 16 g citronové kyseliny a 8 g L-askorbové kyseliny. Tato směs byla 5 minut povařena a následně rozplněna do zavařovacích lahviček, které byly před plněním sterilovány 30 minut v sušárně při teplotě 100 °C. Po naplnění následovalo opatření zavařovacích lahviček šroubovacím víčkem, opláchnutým vroucí vodou. Po vychladnutí byl modelový vzorek uchováván v lednici při teplotě 5 °C.

4.5 Stanovení celkových anthokyanů

Pro stanovení obsahu anthokyanů byl používán postup podle Českého lékopisu 2017 a jeho dodatku z roku 2019 (Zdravotnictví, 2017).

Nejprve byly z modelového vzorku připraveny dvě navážky. Jedna o hmotnosti 2,5 g a druhá o hmotnosti 5 g. U těchto dvou navážek bylo následně postupováno podle

českého lékopisu 2017 a jeho dodatku z roku 2019. Poté byla změřena absorbance a proveden výpočet obsahu celkových anthokyanů. Výsledky z 5 g navážky měly nižší směrodatnou odchylku. Z tohoto důvodu bylo rozhodnuto, že stanovování anthokyanů z 5 g navážky bude poskytovat přesnější výsledky.

Z jedné lahvičky modelového vzorku bylo odebráno 10 navážek a z druhé lahvičky modelového vzorku dalších 10 navážek o hmotnosti 5 g. Následně bylo s navážkami nakládáno totožným způsobem.

5 gramů bylo naváženo do plastové kyvety a smícháno se 40 ml methanolu. Plastová kyveta byla umístěna na 30 minut do třepačky. Poté byla kyveta přendána do centrifugy na 10 minut, kde byla odstředována při 3500 otáčkách za minutu. Následně byl supernatant oddělen do 50 ml odměrné baňky a doplněn na požadovaný objem methanolem. Z této odměrné baňky byl následně odebrán 1 ml vzorku, který byl odpipetován do další odměrné baňky o objemu 50 ml a objem doplněn okyseleným methanolem kyselinou chlorovodíkovou (0,1%). Takto připravený vzorek byl následně ještě zfiltrován přes filtr ze skleněných vláken a filtrát změřen na spektrofotometru při vlnové délce 528 nm. Při měření byl použit jako slepý vzorek okyselený methanol. Měření bylo opakováno třikrát. Z naměřených hodnot byl vypočten obsah anthokyanů pomocí vzorce:

$$x = \frac{A \times 5000}{718 \times m} \times z$$

718...specifická absorbance pro kyanidin-3-O-glukosid-chlorid při 528 nm

A...absorbance při 528 nm

m...hmotnost naváženého vzorku [g]

x...obsah anthokyanů [g/100 g]

z...ředění vzorku

Výsledky tohoto měření jsou zapsány v Tabulka 6: Obsah anthokyanů.

4.6 Stanovení L-askorbové kyseliny

Stanovení obsahu L-askorbové kyseliny bylo prováděno podle postupu pro chromatografické stanovení vitamínu C z diplomové práce obhájené na Jihočeské univerzitě v Českých Budějovicích v roce 2017 (Laxová, 2017).

Z jedné lahvičky modelového vzorku bylo odebráno 10 navážek o hmotnosti 5 g. Z druhé lahvičky modelového vzorku bylo odebráno také 10 navážek o hmotnosti 5 g. Následně bylo s navážkami nakládáno totožným způsobem

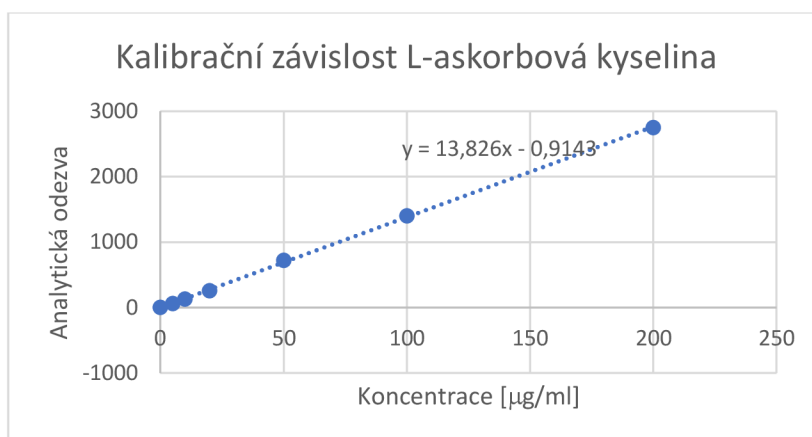
Z modelového vzorku šťávy bylo naváženo přibližně asi 5 g vzorku do 50 ml odměrné baňky. K navážce následně přidána šťavelová kyselina (0,02 mol/l) společně s EDTA (0,5mmol/l), která sloužila jako extrakční činidlo. Tímto extrakčním činidlem byl vzorek doplněn na daný objem 50 ml. Toto extrakční činidlo bylo zvoleno z toho důvodu, že L-askorbová kyselina velmi rychle podléhá oxidaci a toho extrakční činidlo tomu zabraňuje. Každý vzorek byl následně zfiltrován přes filtr ze skleněných vláken do dvou vialek. Ihned po přípravě byl vzorek zanalyzován pomocí HPLC.

Chromatografie byla provedena na přístroji: UHPLC Agilent 1200 Series Rapid Resolution LC Systém na koloně Zorbax SB-C8 (4,6 x 150 mm, zrnitost 5 μ m). Při této analýze byla použita jako mobilní fáze šťavelová kyselina (0,02 M). Objem nastříkovaného vzorku byl 5 μ l. Teplota při analýze byla 25 °C a absorbance vzorku se odečítala při vlnové délce 254 nm. Kvantifikace byla provedena pomocí standardu L-askorbové kyseliny v pracovním rozsahu 5-200 μ g/ml. Kalibrační řada je zapsána v tabulce č. 3, kde x je koncentrace standardu a y je analytická odezva. Výsledky této metody jsou zaznamenány v tabulce č.7.

Tabulka 3: Kalibrační řada pro L-askorbovou kyselinu

Koncentrace (μ g/ml)	Odezva
0	0
5	60,613
10	127,231
20	255,998
50	722,313
100	1401,35
200	2749,18

Obrázek 8: Kalibrační křivka pro L-askorbovou kyselinu s rovnicí regrese



4.7 Stanovení celkových polyfenolů

Nejprve byl modelový vzorek 10x naředěn destilovanou vodou. Vzorek k měření byl připraven smícháním 4 složek: 20 µg zředěného sirupu, 100 µg Folin – Ciocalteauv roztoku, 1980 µg destilované vody a 300 µg 20% roztoku uhličitanu sodného. Tuto směs jsem připravila 20x. Každý vzorek byl smíchán v plastové vialce a nechán reagovat při 20 °C po době 120 minut. Následně byl každý vzorek měřen na spektrofotometru při vlnové délce 765 nm proti slepému vzorku (destilovaná voda). Každý vzorek byl pomocí spektrofotometru proměřen 3x. Výsledky byly vyjádřeny jako ekvivalenty L-askorbové kyseliny pomocí kalibrační řady, ze které vycházela kalibrační rovnice:

$$y = (1201,3157x) - 58,3836$$

4.8 Stanovení obsahu rutinu, kvercetinu a chlorogenové kyseliny

Příprava vzorku

1 g modelového vzorku byl zředěn v 500 ml kádince vodou na 200 ml a bylo přidáno 80 mg L-askorbové kyseliny jako antioxidant a 12,5 ml methanolu. Pomocí pH-metru byla nastavena hodnota pH na 3. Roztok byl zfiltrován na vakuové filtrační aparatuře přes filtr ze skleněných vláken a k promytí zbytků na filtru bylo použito 12,5 ml methanolu. Filtrát byl převeden kvantitativně do 500 ml odměrné baňky a doplněn po rysku.

Pro SPE byly použity kombinované kolonky OASIS, které jsou schopny zachycovat polární i nepolární sloučeniny zároveň. Kolonky byly kondicionovány promytím 10 ml methanolu, poté 10 ml 5% roztoku methanolu. K izolaci sledovaných sloučenin metodou (SPE) byl použit celý objem roztoku. Po aplikaci vzorku byla kolonka sušena 20 minut procházejícím vzduchem.

Zachycené látky byly z kolony vymyty pomocí 1,4 ml methanolu. K získanému vzorku bylo přidáno 200 µg α -naftyloctové kyseliny v methanolickém roztoku jako vnitřní standard.

Měření a výpočet

Připravené vzorky byly analyzovány metodou HPLC. Chromatografická separace byla provedena na přístroji Agilent 1200 Series Rapid Resolution LC System na koloně Zorbax SB-C18 (4,6 x 50 mm, zrnitost 1,8 µm). Separační podmínky odpovídaly publikované práci (Dadáková a Kalinová., 2010).

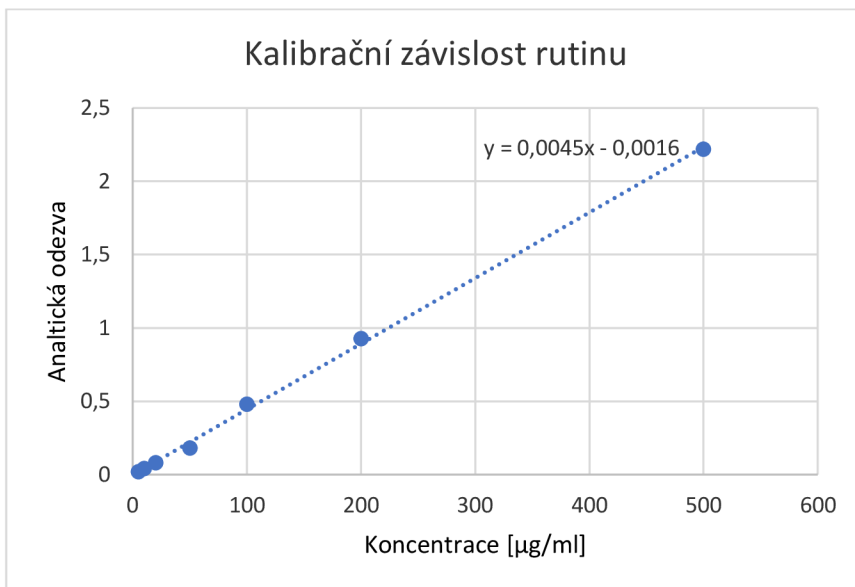
Jako mobilní fáze byly použity roztoky A: 5% acetonitril, 0,1% mravenčí kyselina ve vodě a B: 0,1% mravenčí kyselina v acetonitrilu. Byl použit lineární gradient z 0 na 100% složky B během 15 minut. Nastříkvalo se 5 µl vzorku, teplota při analýze byla 25 °C a absorbance vzorku se odečítala při vlnových délkách 270 (rutin, kvercetin a vnitřní standard) a 330 nm (chlorogenová kyselina). Jako analytická odezva byl použit poměr ploch píku analytu a vnitřního standardu. Kvantifikace byla provedena pomocí standardu rutinu v rozsahu 10-500 mg/kg a chlorogenové kyseliny a kvercetinu v pracovním rozsahu 5-100 mg/kg čerstvého materiálu.

Tabulka 4: Kalibrační řada pro rutin

Koncentrace (ug/ml)	Odezva vnitřního standardu	Odezva rutinu
5	1461,3	28,4
10	1420,3	58,9
20	1405,3	113,3
50	1419,7	256,1
100	1461,0	701,0

200	1440,7	1335,0
500	1429,7	3172,3

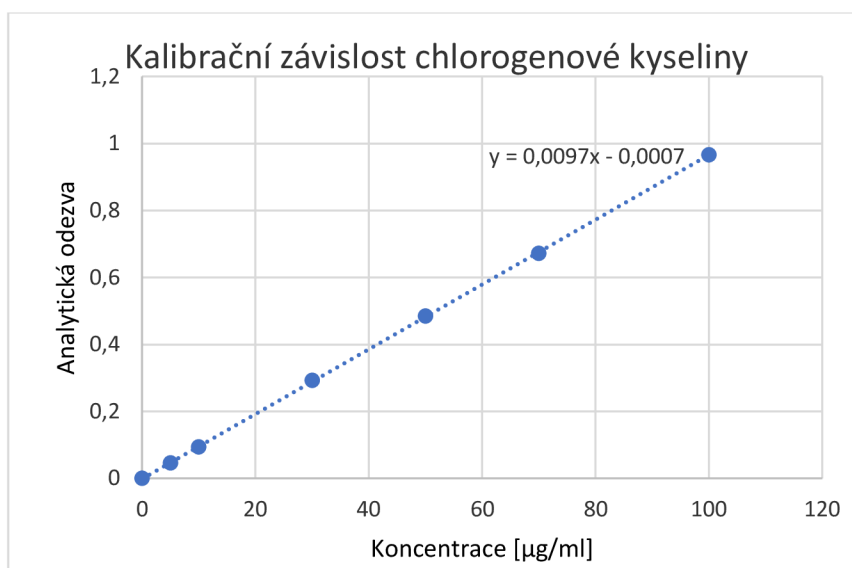
Obrázek 9: Kalibrační křivka pro rutin s rovnicí regrese



Tabulka 5: Kalibrační řada pro chlorogenovou kyselinu

Koncentrace (ug/ml)	Odezva vnitřního standardu	Odezva
0	1466,9	0
5	1425,0	65,5
10	1435,6	134,9
30	1382,1	404
50	1421,0	689
70	1405,8	945,1
100	1385,9	1338,6

Obrázek 10: Kalibrační křivka pro chlorogenovou kyselinu s rovnicí regrese



4.9 Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH

Nejprve byl připraven zásobní roztok radikálu 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylu. 0,025g radikálu bylo rozpuštěno v methanolu. Roztok byl doplněn na objem 100 ml. Poté byla upravena koncentrace roztoku na spektrofotometru na absorbanci A-500 při vlnové délce 515 nm.

Modelový vzorek byl naředěn 10x destilovanou vodou.

Poté bylo smícháno 0,975 ml zásobního roztoku obsahující radikál s 0,025 ml naředěného vzorku do plastové vialky. Takto připravený vzorek byl promíchán pomocí vysokorychlostní třepačky. Vzorek k měření byl připraven 20x.

Poté byl vzorek k měření nechán reagovat po dobu 30 minut při teplotě 20 °C. Následně byla měřena absorbance ve spektrofotometru. Každý ze vzorku byl proměřen 3x v plastové kyvetě při vlnové délce 515 nm. Slepý vzorek tvořila destilovaná voda.

Výsledky byly vyjádřeny jako ekvivalenty L-askorbové kyseliny pomocí kalibrační řady, ze které vycházela kalibrační rovnice:

$$y = 596,9202 - 1213,339x$$

4.10 Stanovení antioxidační aktivity metodou FRAP

Nejprve byl připraven čerstvý (vzhledem k velmi rychlé oxidaci roztoku chloridu železitého je čerstvost důležitá) 20 mN roztok chloridu železitého, acetátový pufr o pH=3,6 a roztok radikálu. Roztok radikálu byl připraven smícháním 96 ml destilované vody s 4 ml 1 molární kyselinou chlorovodíkovou a 312 g radikálu (2,4,6 – Tris(2-pyridyl)-s-triazine).

Smícháním 5ml 20nM roztoku chloridu železitého s 5 ml roztoku obsahující radikál a 50 ml acetátového pufru vznikla směs připravena pro následné měření. 900 µl této směsi bylo smícháno s 30 µl 50x naředěného vzorku. Následně směs reagovala po dobu 30 minut při teplotě 37 °C. Poté byl vzorek měřen na spektrofotometru při vlnové délce 593nm.

Výsledky byly vyjádřeny jako ekvivalenty L-askorbové kyseliny pomocí kalibrační řady, ze které vycházela kalibrační rovnice:

$$y = 497,8549x - 94,1715$$

4.11 Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS

Nejprve byl připraven PBS z 5mM roztoku dihydrogenfosforečnanu draselného a 5mM roztok dihydrogenfosforečnanu sodného. Následně bylo upraveno pH na 7,4.

Následně byl připraven radikál smícháním 54,8 mg ABTS s 1 g oxidu manganičitého a 20 ml destilované vody. Takto připravená směs byla míchána magnetickým míchadlem po dobu 20 minut při pokojové teplotě. Poté pomocí 5 µm filtr byla směs zfiltrována do kádinky. Do filtrátu byl přidáván pufr PBS, až byla absorbance při vlnové délce 734 A=0,8(±0,02). Vzhledem k tomu, že je radikál velmi nestabilní musela být absorbance upravována v průběhu celého měření.

Aby byl modelový vzorek připraven k měření musel být 800x zředěn destilovanou vodou. Ředění bylo prováděno ve 2 stupních nejprve 100x a následně 8x.

V posledním kroku bylo smícháno 100 µl zředěného vzorku s 1 ml radikálu. Tato směs reagovala po dobu 1 minuty. Poté byla měřena na spektrofotometru při absorbanci 734. Slepý vzorek byl tvořen destilovanou vodou.

Výsledky byly vyjádřeny jako ekvivalenty L-askorbové kyseliny pomocí kalibrační řady, ze které vycházela kalibrační rovnice:

$$y = 51,4829 - 68,3952x$$

5 Výsledky a diskuze

V diplomové práci byly stanovovány hlavní komponenty obsaženy v modelovém vzorku (L-askorbová kyselina, chlorogenová kyselina, anthokyany, celkové polyfenoly, kvercetin a rutin). Následně byla měřena antioxidační aktivita modelového vzorku pomocí metody: ABTS, FRAP, DPPH. Poté byly zjišťovány korelace mezi hlavními komponenty a jednotlivými metodami měřícími antioxidační aktivitu.

5.1 Obsah celkových anthokyanů v modelovém vzorku

Tabulka 6: Obsah anthokyanů

Hmotnost navážky [g]	Absorbance [-]	Obsah anthokyanů [mg/kg]	Aritmetický průměr ±SD [mg/kg]
5,03	0,160	2250	2160±139
	0,160	2220	
	0,159	2200	
5,00	0,160	2230	
	0,158	2200	
	0,155	2160	
5,00	0,157	2190	
	0,160	2230	
	0,160	2230	
5,00	0,150	2090	
	0,149	2080	
	0,153	2130	
5,00	0,174	2420	
	0,173	2410	
	0,182	2530	
5,03	0,155	2150	

	0,152	2100
	0,154	2130
5,01	0,166	2310
	0,159	2210
	0,159	2210
5,00	0,149	2080
	0,146	2030
	0,150	2090
5,03	0,159	2200
	0,159	2200
	0,158	2190
5,02	0,159	2210
	0,159	2210
	0,159	2210
5,03	0,136	1880
	0,135	1870
	0,136	1880
5,03	0,147	2040
	0,141	1950
	0,144	1990
5,07	0,151	2070
	0,153	2100
	0,155	2130
5,07	0,205	2820
	0,146	2010
	0,151	2070
5,07	0,148	2030
	0,150	2060
	0,146	2010
5,03	0,150	2080
	0,151	2090
	0,157	2170

5,10	0,160	2180
	0,158	2160
	0,161	2200
5,06	0,164	2300
	0,162	2230
	0,153	2240
5,08	0,138	1890
	0,141	1930
	0,138	1890
5,05	0,170	2340
	0,172	2370
	0,175	2410

Obsah anthokyanů v plodech bezu podle Českého lékopisu 2017 stanovovala i Lenka Kratochvílová ve své bakalářské práci. Stanovení prováděla ze syrových plodů bezu černého (bezinek). V práci zjistila, že obsah anthokyanů v bezinkách je podle lékopisné metody 7948 mg/kg (Kratochvílová 2020). Což je přibližně 4x vyšší obsah, než byl obsah naměřen v modelovém vzorku. Toto porovnání dokazuje, že během tepelného zpracování bezinek dochází k poklesu koncentrace anthokyanů. Vliv má také složení modelového vzorku. Modelový sirup byl uvařen a z 50% tvořen přidanou sacharózu. Toto složení také negativně ovlivňuje závěrečný obsah anthokyanů v modelovém vzorku.

Množství anthokyanů v modelovém vzorku bylo 2160 mg/kg. Hodnoty jsou vyšší, než uvádí studie (Garcia-Herrera a kol., 2016), kde měřili koncentrát z bezinek a anthokyanu stanovovali pomocí HPLC metody. Naměřili 1582 mg/kg nejvíce zastoupeného anthokyanu.

Studie (Neves a kol., 2021), ve které se zaměřili na obsah průmyslového koncentrátu z bezinek, naměřili nižší obsah anthokyanů, než u modelového vzorku. Obsah anthokyanů dle studie byl 1580 mg/kg. Tento výsledek se shoduje se studií prováděnou (Garcia-Herrera a kol., 2016).

Ve studii porovnávali (Du a Myracle, 2018) obsah anthokyanů a polyfenolů v kefiru z čerstvé šťávy z bezinek. Hodnoty, které naměřili, jsou v kefiru obsahující mléko velmi nízké oproti hodnotám naměřených v modelovém vzorku. 186,7 mg/kg.

Hodnotám, které byly naměřeny v modelovém vzorku se blíží hodnoty, které v této studii naměřili u výchozího sirupu 2756,4 mg/kg. Tento výchozí sirup používali pro výrobu kefiru.

5.2 Obsah L-askorbové kyseliny v modelovém vzorku

Podmínky, které byly pro analýzu použity, způsobily s největší pravděpodobností to, že koelují všechny formy L-askorbové kyseliny.

Tabulka 7: Obsah L-askorbové kyseliny

Hmotnost navážky [g]	Odezva [-]	Obsah L-askorbové kyseliny [mg/kg]	Aritmetický průměr ±SD [mg/kg]
1,02	1390	4930	4970±44,9
	1380	4930	
1,01	1390	4980	
	1400	5010	
1,02	1390	4920	
	1400,	4970	
1,02	1380	4890	
	1400	4960	
1,04	1440	5020	
	1440	5000	
1,07	1450	4890	
	1460	4920	
1,04	1430	4980	
	1420	4930	
1,04	1420	4940	
	1420	4940	
1,07	1450	4900	

	1470	4960
1,03	1420	4990
	1420	4990
1,03	1410	4950
	1410	4960
1,00	1360	4920
	1380	4980
1,00	1380	4990
	1400	5070
1,00	1380	5000
	1390	5010
1,03	1420	4990
	1420	5000
1,04	1440	5010
	1420	4940
1,06	1450	4950
	1450	4960
1,05	1460	5040
	1470	5070
1,05	1450	5000
	1440	4970
1,10	1450	4930
	1480	4870

Ve studii (Sadilova a kol., 2009) stanovovali obsah L-askorbové kyseliny v průmyslově vyráběné bezové šťávě. Tuto šťávu vyrábí německá společnost Ernteband Fruchtsaft GmbH. Šťáva byla vyrobena pomocí přísad glukózy, fruktózy, nebo sacharózy. A následně přidanou L-askorbovou kyselinou. Studie byla prováděna za zvýšené teploty. Koncentrace L-askorbové kyseliny v bezové šťávě byla 1,11 mg/l. Tato velmi nízká hodnota byla naměřena ve šťávě s přísadami sacharidů a L-askorbové kyseliny v množství, které studie neuvádí. Jedná se o velmi nízký obsah L-askorbové kyseliny, oproti obsahu v modelovém vzorku (4970 mg/kg) Výše

naměřené L-askorbové kyseliny nelze srovnávat z důvodu neznámého obsahu L-askorbové kyseliny ve šťávě.

Pro studii používali (Netzel a kol., 2002) ovocný sirup složený z: 30 % šťávy z bílých hroznů, 25 % černého rybízu, 15 % černého bezu, 10 % višně, 10 % ostružin a 10 % arónie. Tento sirup obsahoval 103 mg/l L-askorbové kyseliny. Sirup nebyl o L-askorbovou kyselinu obohacen. Je to obsah nižší, než u modelového vzorku, což je opět způsobeno obohacením modelového vzorku o L-askorbovou kyselinu.

Dle studie (Kabasakalis a kol., 2000) se obsah L-askorbové kyseliny v průmyslově vyráběných džusech pohybuje v rozmezí 24 – 430 mg/1000 ml šťávy. Studie se více zabývala stálostí L-askorbové kyseliny. Během čtyř měsíců při této studii ztratily džusy obsah L-askorbové kyseliny o 29 – 41 % při pokojové teplotě. V lednici stanovili ztrátu během 31 dnů 60 – 67 % L-askorbové kyseliny. Tato studie potvrzuje ztrátu L-askorbové kyseliny v závislosti na čase. Což se potvrdilo i v modelovém vzorku, který bylo nutné obohatit L-askorbovou kyselinu.

Na obsah L-askorbové kyseliny se zaměřili ve studii (Varming a kol., 2013), která zkoumala obsah kyseliny L-askorbové v průmyslově vyráběných jablečných džusech. Celkem k analýze použili 18 vzorků. Z nichž ve 14 vzorcích byl obsah L-askorbové kyseliny nižší než 10 mg/l. Nejvyšší naměřený obsah byl 26 mg/l. Vzhledem k tomu, že se jedná o velmi nízké obsahy, můžeme považovat výsledky za velmi podobné modelovému vzorku za předpokladu, že by nebyl obohacen o L-askorbovou kyselinu. Tato studie také prokázala nestabilitu L-askorbové kyseliny při jakékoli úpravě čerstvého ovoce.

5.3 Obsah celkových polyfenolů v modelovém vzorku

Tabulka 8: Obsah celkových polyfenolů vyjádřen jako ekvivalent L-askorbové kyseliny

Hmotnost navážky [mg]	Odezva [-]	Obsah celkových polyfenolů [mg/l]	Aritmetický průměr ± SD [mg/l]
10	0,650	722	679 ± 115
	0,491	531	

	0,464	499
10	0,518	564
	0,457	491
	0,608	672
10	0,532	581
	0,485	524
	0,696	778
10	0,694	678
	0,650	722
	0,651	724
10	0,613	653
	0,469	505
	0,471	507
10	0,592	740
	0,658	732
	0,474	511
10	0,665	684
	0,640	710
	0,699	781
10	0,681	732
	0,655	728
	0,757	851
10	0,658	632
	0,640	710
	0,688	768
10	0,575	814
	0,663	738
	0,802	905
10	0,726	731
	0,644	715
	0,629	697
10	0,657	380

	0,705	789
	0,550	602
10	0,365	571
	0,495	536
	0,522	569
10	0,524	769
	0,704	787
	0,601	664
10	0,689	731
	0,503	546
	0,636	706
10	0,657	731
	0,637	707
	0,606	669
10	0,659	733
	0,694	775
	0,688	768
10	0,621	688
	0,787	887
	0,725	813
10	0,560	614
	0,631	700
	0,356	370
10	0,588	648
	0,727	815
	0,694	775

Množství celkových polyfenolů v modelovém vzorku bylo 679 mg/l. Velmi odlišné hodnoty naměřili i (Neves a kol., 2021) ve své studii, kde měřili obsah významných látek v průmyslově vyráběných koncentrátech z bezinek. V jejich studii naměřili hodnoty pro celkové polyfenoly 54700 mg/kg. Vzhledem k tomu, že ve své studii neuvádí složení koncentrátu, nelze tato odlišnost odůvodnit.

Ve studii (Du a Myracle, 2018) měřili obsah polyfenolů v kefiru. Tento kefir vyrobili z bezinkové šťávy. Kefír vyroben z průmyslové šťávy obsahoval 201,3 mg/l celkových polyfenolů, kefir vyroben z čerstvé šťávy obsahoval 435,0 mg/l. Čerstvá šťáva, která byla použita pro výrobu kefiru, obsahovala 36947,5 mg/l celkových polyfenolů. Oba produkty v podobě kefiru obsahují řádově stejné množství polyfenolů v porovnání s modelovým vzorkem (679 mg/l). Naopak čerstvá šťáva obsahuje mnohonásobně vyšší obsah polyfenolů.

Ve studii (Che Malek a kol., 2019) použili 5 odlišných vzorků průmyslově vyráběných koncentrátů z granátových jablek. Obsah celkových polyfenolů se v koncentráte pohyboval od 183 – 32600 mg/l. Do této velmi široké škály se řadí i modelový vzorek, který obsahuje 679 mg/l celkových polyfenolů.

5.4 Obsah rutinu v modelovém vzorku

Tabulka 9: Obsah rutinu

Hmotnost navážky [g]	Odezva [-]	Obsah rutinu [mg/kg]	Aritmetický průměr ± SD [mg/kg]
1,13	1180	207	201 ± 0,950
1,12	1210	212	
1,03	1040	187	
1,03	1120	206	
1,01	9580	186	
1,05	1070	197	
1,01	1000	192	
1,08	1130	203	
1,05	1062	204	
1,08	1130	202	
1,11	1150	215	
1,04	1150	196	
1,02	1070	208	

1,07	1140	205	
1,01	1050	201	
1,03	1030	196	
1,06	1120	201	
1,04	1110	203	
1,00	1060	201	
1,04	1050	195	

Stanovením rutinu se zabývali ve studii (En-Nakra a kol., 2021), kde zakoupili pomerančovou šťávu na trhu a následně ji analyzovali. V této pomerančové šťávě naměřili obsah rutinu 0,105 mmol/l. Při přepočtu analyzovaného vzorku obsahuje 0,344 mmol/l. z čehož vyplývá, že modelový vzorek obsahuje větší množství rutinu.

Obsah rutinu stanovovali ve studii (Memon a kol., 2017), kde se zaměřili na komerční jablečný a pomerančový džus. Obsah rutinu v jablečném i pomerančovém džusu byl pod mezí stanovitelnosti. Obsah v čerstvé pomerančové šťávě byl také pod mezí stanovitelnosti. Obsah rutinu v čerstvé jablečné šťávě byl 0,107 ml/l. Což je oproti obsahu rutinu v modelovém vzorku zanedbatelné množství.

5.5 Obsah kvercetinu v modelovém vzorku

V žádném ze vzorků nebyl obsah volného kvercetinu vyšší než 5 mg/kg, což představuje mez stanovitelnosti použité metody. Znamená to tedy, že za podmínek přípravy modelového sirupu je rutin stabilní a nedochází k jeho rozkladu a uvolnění volného kvercetinu.

5.6 Obsah chlorogenové kyseliny v modelovém vzorku

Tabulka 10: Obsah chlorogenové kyseliny

Hmotnost navážky [g]	Odezva [-]	Obsah chlorogenové kyseliny [mg/kg]	Aritmetický průměr ± SD [mg/kg]
1,13	301	24,4	26,0 ± 0,265
1,12	306	24,8	
1,03	286	23,9	
1,03	308	26,2	
1,01	294	26,5	
1,05	316	26,9	
1,01	304	27,0	
1,08	323	27,0	
1,05	301	26,9	
1,08	301	25,0	
1,11	314	27,1	
1,04	310	28,2	
1,02	293	26,9	
1,07	312	24,4	
1,01	318	25,7	
1,03	305	26,1	
1,06	293	26,0	
1,04	304	1090	
1,00	298	1110	
1,04	300	1070	

Obsahové látky měřili ve studii u koncentrátu z bezu. (Neves a kol., 2021) použili pro analýzu dva vzorky odebrané ze stejné bezové šťávy. Přičemž v jednom koncentrátu byl naměřen obsah chlorogenové kyseliny 750 mg/kg. U druhého vzorku byl obsah vyšší a to o 111 mg/kg. Tyto výsledky jsou mnohonásobně vyšší než

naměřené hodnoty v modelovém vzorku. Což může být způsobeno obsahem 50 % sacharózy v modelovém vzorku.

5.7 Antioxidační aktivita naměřena pomocí DPPH

Tabulka 11: Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH vyjádřené jako ekvivalent *L*-askorbové kyseliny

Hmotnost navážky [ml]	Odezva [-]	Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH [mg/l]	Aritmetický průměr ±SD [mg/l]
10	0,403	108	100 ± 6,93
	0,406	104	
	0,404	107	
10	0,411	98,2	
	0,408	102	
	0,411	98,2	
10	0,411	98,2	
	0,411	98,2	
	0,411	98,2	
10	0,405	105	
	0,410	99,5	
	0,413	95,8	
10	0,403	108	
	0,402	109	
	0,407	103	
10	0,413	95,8	
	0,414	94,6	
	0,413	95,8	
10	0,418	89,7	
	0,411	98,2	

	0,417	103
10	0,418	89,7
	0,415	93,4
	0,416	92,2
10	0,414	94,6
	0,416	92,2
	0,413	95,8
10	0,421	86,1
	0,416	92,2
	0,418	89,7
10	0,422	84,9
	0,411	98,2
	0,412	97,0
10	0,411	98,2
	0,417	91,0
	0,417	91,0
10	0,401	110
	0,400	112
	0,406	104
10	0,406	104
	0,406	104
	0,408	102
10	0,411	98,2
	0,409	101
	0,405	106
10	0,405	106
	0,404	108
	0,402	109
10	0,402	109
	0,404	107
	0,400	112
10	0,406	104

	0,409	101	
	0,411	98,2	
10	0,410	99,5	
	0,408	102	
	0,396	116	
10	0,403	108	
	0,403	108	
	0,406	104	

Průměrná hodnota antioxidační aktivity stanovená metodou DPPH činila 100 mg/l L-askorbové kyseliny, což je 0,568 mmol/l L-askorbové kyseliny

Ve své studii měřili antioxidační aktivitu i (Du a Myracle, 2018), kde vyráběli kefir z bezinkového průmyslového sirupu a čerstvé šťávy bezinek. Antioxidační aktivita naměřena u kefirového produktu z průmyslové šťávy byla 61650 mg/l. V kefiru vyrobeného z čerstvé šťávy 20860 mg/l a v čerstvé šťávě 1540. Z tohoto výzkumu vyplývá, že celkový kefir obsahoval ještě další látky vykazující antioxidační aktivitu. Složení průmyslové šťávy ani čerstvého sirupu studie neuvádí. Ani nejnižší hodnota neodpovídá řádově hodnotám, které byly stanoveny v této práci (100 mg/l) což je způsobeno stářím použitých bezinek a složením modelového vzorku, který obsahuje 50% sacharózy.

Ve studii stanovovali (Jakobek a kol., 2007) obsah významných látek v několika druzích koncentrátů. Mezi vzorky byl i koncentrát z bezinek. Pomocí metody DPPH stanovili, že v koncentrátu je obsaženo 6,214 mmol/ml. Což je v přepočtu mnohonásobně vyšší antioxidační aktivita než aktivita modelového vzorku. Tento rozdíl je způsoben naředěním koncentrátu.

Antioxidační aktivita byla měřena i ve studii (Nowak a kol., 2017) pomocí metody DPPH, kde byly použity průmyslové šťávy. U šťávy z bezinek byla naměřena antioxidační aktivita 2744 mg/l. Tato hodnota je mnohonásobně vyšší než hodnota naměřena u modelového vzorku. V této studii byla naměřena nejnižší antioxidační aktivita u šťávy z brusinek (962 mg/l), naopak nejvyšší u arónie (5281 mg/l).

5.8 Antioxidační aktivita naměřena pomocí FRAP

Tabulka 12: Stanovení antioxidační aktivity metodou FRAP vyjádřené jako ekvivalent *L*-askorbové kyseliny

Hmotnost navážky [mg]	Odezva [-]	Stanovení antioxidační aktivity metodou FRAP [mg/l]	Aritmetický průměr ± SD [mg/l]
2	1,39	15000	13200 ± 1810
	1,48	16000	
	1,37	14700	
2	1,25	13300	
	1,34	14300	
	1,46	15800	
2	1,34	14300	
	1,32	14100	
	1,38	14800	
2	1,13	11700	
	1,02	10400	
	1,20	12500	
2	1,23	12900	
	1,25	13200	
	1,16	12100	
2	1,48	16100	
	1,32	14100	
	1,37	14700	
2	1,27	13400	
	1,19	12500	
	1,20	12600	
2	1,22	12800	

	1,24	13000
	1,27	13400
2	1,21	12700
	1,16	12100
	1,19	12400
2	1,57	17200
	1,60	17600
	1,43	15500
2	1,08	11100
	1,12	11500
	1,07	11000
2	1,37	14700
	1,30	13900
	1,38	14800
2	1,44	15500
	1,11	11400
	1,43	15400
2	1,19	12500
	1,10	11300
	1,18	12300
2	1,08	11100
	1,11	11400
	1,18	12300
2	1,16	12100
	1,02	10400
	1,14	11900
2	1,19	12400
	1,30	13800
	1,33	14200
2	1,32	14100
	1,19	12500
	1,20	12600

2	0,97	9730	
	0,94	9320	
	0,96	9540	
2	1,44	15500	
	1,23	12900	
	1,29	13700	

Průměrná hodnota antioxidační aktivity stanovená metodou FRAP činila 13200 mg/l L-askorbové kyseliny, což je 75 mmol/l L-askorbové kyseliny.

Vědci (Codoñer-Franch a kol., 2008) se zaměřili na měření antioxidační aktivity u 100% šťávy z mandarinek pěstovaných ve Španělsku. Pomocí metody FRAP naměřili (1190 mmol/l). Tato hodnota je mnohonásobně vyšší, než přepočet u modelového vzorku (75 mmol/l). Tento rapidní rozdíl je způsoben odlišností ovoce, ze kterého byla šťáva vyrobena, dále naředěním modelového vzorku, přidáním sacharózy a následně použitím nečerstvých bezinek.

Na stanovení antioxidační aktivity se zaměřili i ve studii (Wern a kol., 2016), kde měřili obsah v čerstvé šťávě, 100% komerční šťávě a ovocném nápoji. Nejvyšší antioxidační aktivita v čerstvé šťávě byla naměřena u kvajájové šťávy (7700 mmol/l). Naopak nejnižší množství u čerstvé šťávy z granátového jablka (2677 mmol/l). Vzhledem k tomu, že se jedná o čerstvé šťávy je pochopitelné, že antioxidační aktivita je mnohonásobně vyšší, než u modelového vzorku. U 100% komerční šťávy byla nejvyšší antioxidační aktivita naměřena u výrobku z grepu (27050 mmol/l). Naopak nejnižší u šťávy z jablka (1094 mmol/l). Vzhledem k tomu kolikrát je vyšší antioxidační aktivita u grepové komerční šťávy je zřejmé, že tato šťáva musela být při výrobě obohacena. V ovocném nápoji vykazuje nejnižší antioxidační aktivitu grepový nápoj (133 mmol/l). Naopak nejvyšší antioxidační aktivitu kvajájový nápoj (2057 mmol/l).

5.9 Antioxidační aktivita naměřena pomocí ABTS

Tabulka 13: Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS vyjádřené jako ekvivalent *L*-askorbové kyseliny

Hmotnost navážky [ml]	Odezva [-]	Stanovení antioxidační aktivity metodou FRAP [mg/l]	Aritmetický průměr ±SD [mg/l]
1	0,502	13700	13700 ±1610
	0,499	13900	
	0,498	13900	
1	0,538	11700	
	0,538	11700	
	0,545	11400	
1	0,517	12900	
	0,526	12400	
	0,521	12700	
1	0,510	13300	
	0,489	14400	
	0,499	13800	
1	0,466	15700	
	0,469	15500	
	0,471	15400	
1	0,532	12100	
	0,531	12100	
	0,528	12300	
1	0,504	13600	
	0,533	12000	
	0,532	12100	
1	0,544	11400	

	0,541	11600
	0,547	11300
1	0,459	16100
	0,427	17800
	0,426	17900
1	0,473	15300
	0,479	15000
	0,493	14200
1	0,522	12600
	0,555	10800
	0,519	12800
1	0,472	15400
	0,462	15900
	0,471	15400
1	0,511	13200
	0,542	11500
	0,487	14500
1	0,488	14500
	0,485	14600
	0,474	15300
1	0,504	13600
	0,512	13200
	0,500	13800
1	0,502	13700
	0,537	11800
	0,498	13900
1	0,470	15400
	0,467	15600
	0,467	15600
1	0,528	12300
	0,528	12300
	0,530	12200

1	0,480	14900	
	0,489	14400	
	0,482	14800	
1	0,502	13700	
	0,509	13300	
	0,506	13500	

Průměrná hodnota antioxidační aktivity stanovená metodou ABTS činila 13700 mg/l L-askorbové kyseliny, což je 77 mmol/l L-askorbové kyseliny.

Vědci (Codoñer-Franch a kol., 2008) se zaměřili na měření antioxidační aktivity u 100% šťávy z mandarinek pěstovaných ve Španělsku. Pomocí metody ABTS naměřili 22,6 mmol/l. Tato hodnota je mnohonásobně nižší, než přepočet u modelového vzorku (77 mmol/l). Tento rapidní rozdíl je způsoben odlišností ovoce, ze kterého byla šťáva vyrobena.

Antioxidační aktivitu měřila studie (Juranović Cindrić a kol., 2011) u 5 druhů jablečných džusů. Naměřené hodnoty se pohybovaly od 1,33 mmol/l do 1,60 mmol/l. Při přepočtu na stanovovaný vzorek, byla antioxidační aktivita mnohonásobně nižší, než u modelového vzorku.

Antioxidační schopnosti pomocí metody ABTS měřili ve studii (Pliszka, 2017), kde stanovovali antioxidační aktivitu u šťávy ze 4 druhů bezu černého, průměrná antioxidační aktivita byla 2,75 mmol/l. Tato hodnota je mnohonásobně nižší, než antioxidační aktivita u modelového vzorku (77 mmol/l).

5.10 Souhrnné porovnání

Tabulka 14: Souhrnné zobrazení obsahu stanovovaných obsahových látek v modelovém vzorku

	Aritmetický průměr ±SD
Obsah L-askorbové kyseliny [mg/kg]	4970±44,9
Obsah chlorogenové kyseliny [mg/kg]	26,0±0,265
Obsah anthokyanů [mg/kg]	2160±139
Obsah kvercetinu [mg/kg]	-
Obsah rutinu [mg/kg]	201±0,950
Obsah celkových polyfenolů [mg/l]	679±115

Obsahové látky i antioxidační aktivita s porovnáním s ostatními produkty se velmi liší. Tyto odlišnosti jsou způsobeny porovnáváním různých druhů ovoce, odlišného ředění a složení ovocných výrobků. Vliv má i stáří použitého ovoce pro výrobu produktů a také tepelné, nebo jiné zpracování produktu.

6 Statistické zpracování

Při statistickém zpracování naměřených dat byl využit Pearsonův korelační koeficient. U každé naměřené metody bylo k dispozici 20 výsledků, se kterými se následně pracovalo. Měřeno bylo na hladině významnosti 0,05. Vždy byla testována nulová hypotéza proti alternativní. Nulová hypotéza předpokládala, že naměřené výsledky jsou na sobě nezávislé. Naopak alternativní hypotéza předpokládala, že naměřené výsledky jsou na sobě závislé.

Statistika byla zpracovávána v programu *STATISTICA*. Nejprve se ověřila normalita dat pomocí bodového grafu. Po ověření normality dat se pokračovalo ke konkrétní analýze pomocí Pearsonova korelačního koeficientu. Výsledkem tohoto testu bylo p-value, kde jsou možné dvě varianty:

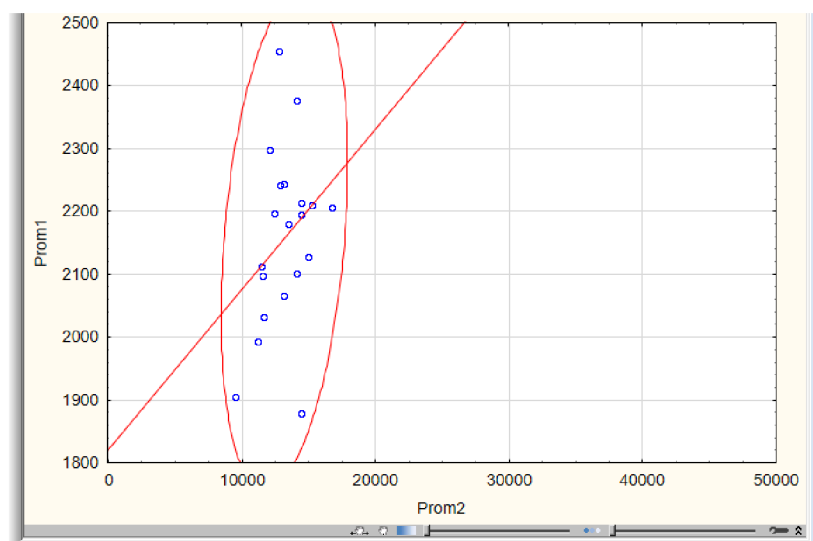
1. $p\text{-value} > 0,05$ přičemž není zamítnuta nulová hypotéza, protože test neprokázal platnost alternativní hypotézy
2. $p\text{-value} < 0,05$ nulová hypotéza je zamítnuta a přechází v platnost alternativní hypotéza

6.1 Závislost FRAP na anthokyanech

H_0 : Antioxidační aktivita naměřena pomocí metody FRAP v modelovém vzorku je nezávislá na koncentraci anthokyanů v modelovém vzorku

H_1 : Antioxidační aktivita naměřena pomocí metody FRAP v modelovém vzorku je závislá na koncentraci anthokyanů v modelovém vzorku

Obrázek 11: Ověření normality dat u antioxidační metody FRAP a koncentraci anthokyanů v modelovém vzorku



Obrázek 12: Ověření nulové hypotézy o nezávislosti antioxidační metody FRAP na koncentraci anthokyanů v modelovém vzorku

Korelace (Tabulka1)	
Označ. korelace jsou významné na hlad. $p < ,05000$	
N=20 (Celé případy vynechány u ChD)	
Proměnná	
Prom1	
	Prom1
	Prom2
Prom2	

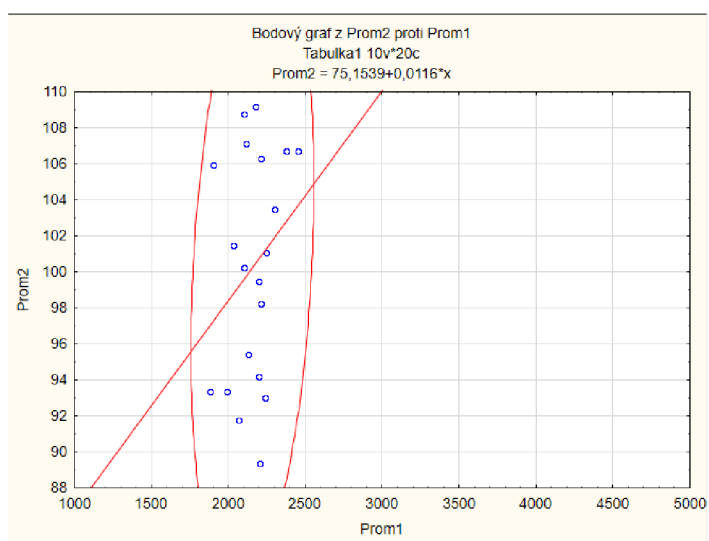
Závěr: $p\text{-value} = 0,194 > 0,05$ hypotézu H_0 nezamítá. Korelační analýza neprokázala, že výsledky obou testů na sobě závisí.

6.2 Závislost DPPH na anthokyanech

H_0 : Antioxidační aktivita naměřena pomocí metody DPPH v modelovém vzorku je nezávislá na koncentraci anthokyanů v modelovém vzorku

H_1 : Antioxidační aktivita naměřena pomocí metody DPPH v modelovém vzorku je závislá na koncentraci anthokyanů v modelovém vzorku

Obrázek 13: Ověření normality dat u antioxidační metody DPPH a koncentraci anthokyanů v modelovém vzorku



Obrázek 14: Ověření nulové hypotézy o nezávislosti antioxidační metody DPPH na koncentraci anthokyanů v modelovém vzorku

Korelace (Tabulka1)	
Označ. korelace jsou významné na hlad. p < ,05000	
N=20 (Celé případy vynechány u ChD)	
Proměnná	
Prom1	1,0000
Prom2	,2607
	p= ---
Prom2	,2607
	p= ,267
	1,0000
	p= ,267
	p= ---

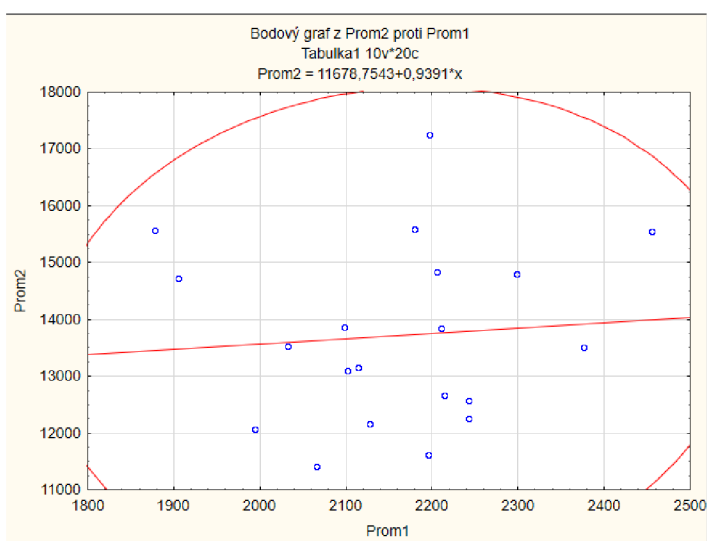
Závěr p-value = 0,267 > 0,05 hypotézu H_0 nezamítá. Korelační analýza neprokázala, že výsledky obou testů na sobě závisí.

6.3 Závislost ABTS na anthokyanech

H_0 : Antioxidační aktivita naměřena pomocí metody ABTS v modelovém vzorku je nezávislá na koncentraci anthokyanů v modelovém vzorku

H_1 : Antioxidační aktivita naměřena pomocí metody ABTS v modelovém vzorku je závislá na koncentraci anthokyanů v modelovém vzorku

Obrázek 15: Ověření normality dat u antioxidační metody ABTS a koncentraci anthokyanů v modelovém vzorku



Obrázek 16: Ověření nulové hypotézy o nezávislosti antioxidační metody ABTS na koncentraci anthokyanů v modelovém vzorku

		Korelace (Tabulka1)	
		Označ. korelace jsou významné na hlad. $p < ,05000$	
		N=20 (Celé případy vynechány u ChD)	
Proměnná		Prom1	Prom2
Prom1		1,0000	,0857
		$p=---$	$p=,719$
Prom2		,0857	1,0000
		$p=,719$	$p=---$

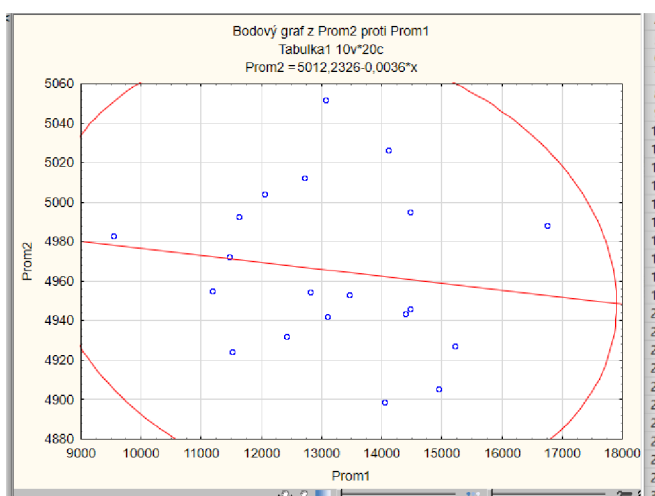
Závěr: $p\text{-value} = 0,719 > 0,05$ hypotézu H_0 nezamítá. Korelační analýza neprokázala, že výsledky obou testů na sobě závisí.

6.4 Závislost FRAP na L-askorbové kyselině

H₀: Antioxidační aktivita naměřena pomocí metody FRAP v modelovém vzorku je nezávislá na koncentraci L-askorbové kyselině v modelovém vzorku

H₁: Antioxidační aktivita naměřena pomocí metody FRAP v modelovém vzorku je závislá na koncentraci L-askorbové kyselině v modelovém vzorku

Obrázek 17: Ověření normality dat u antioxidační metody FRAP a koncentraci L-askorbové kyseliny v modelovém vzorku



Obrázek 18: Ověření nulové hypotézy o nezávislosti antioxidační metody FRAP na koncentraci L-askorbové kyseliny v modelovém vzorku

		Korelace (Tabulka1)	
		Označ. korelace jsou významné na hlad. p < ,05000	
		N=20 (Celé případy vynechány u ChD)	
Proměnná		Prom1	Prom2
Prom1		1,0000	-,1474
		p= ---	p=,535
Prom2		-,1474	1,0000
		p=,535	p= ---

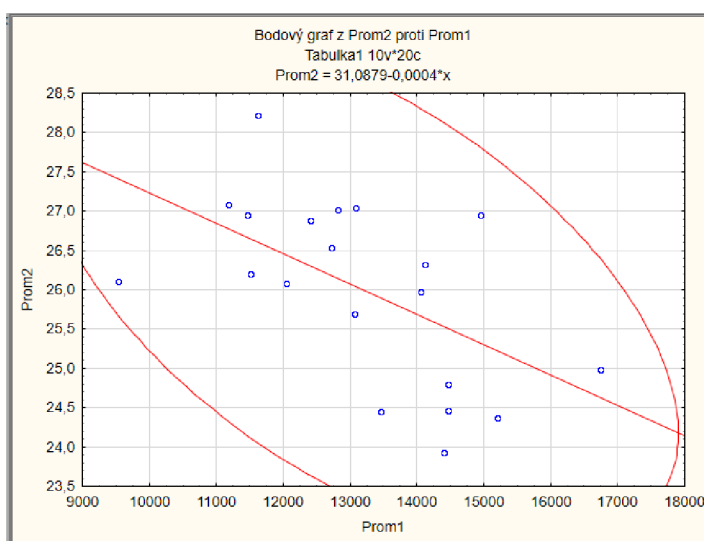
Závěr: p-value = 0,535 > 0,05 hypotézu H_0 nezamítá. Korelační analýza neprokázala, že výsledky obou testů na sobě závisí.

6.5 Závislost FRAP na chlorogenové kyselině

H_0 : Antioxidační aktivita naměřena pomocí metody FRAP v modelovém vzorku je nezávislá na koncentraci kyseliny chlorogenové modelovém vzorku

H_1 : Antioxidační aktivita naměřena pomocí metody FRAP v modelovém vzorku je závislá na koncentraci kyseliny chlorogenové v modelovém vzorku

Obrázek 19:Ověření normality dat u antioxidační metody FRAP a koncentraci chlorogenové kyseliny v modelovém vzorku



Obrázek 20:Ověření nulové hypotézy o nezávislosti antioxidační metody FRAP na koncentraci chlorogenové kyseliny v modelovém vzorku

Proměnná	Korelace (Tabulka1)	
	Prom1	Prom2
Prom1	1,0000	-,5623
	p= ---	p=,010
Prom2	-,5623	1,0000
	p=,010	p= ---

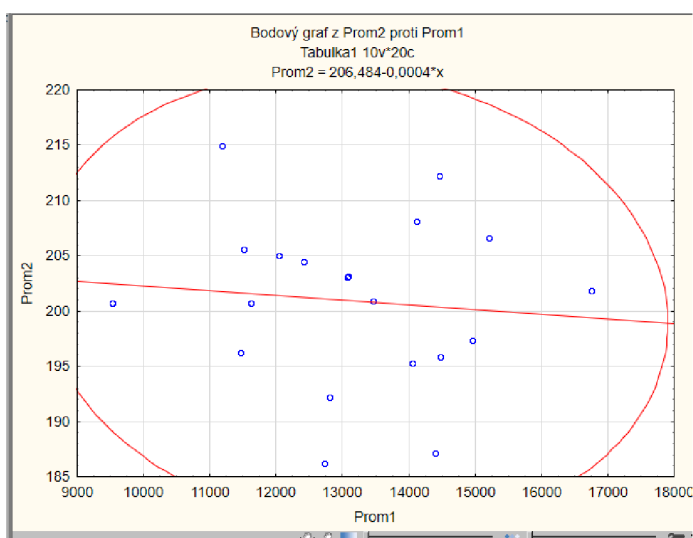
Závěr: p-value = 0,01 < 0,05 hypotézu H_0 zamítá. Korelační analýza prokázala, že výsledky obou testů na sobě závisí

6.6 Závislost FRAP na rutinu

H_0 : Antioxidační aktivita naměřena pomocí metody FRAP v modelovém vzorku je nezávislá na koncentraci rutinu modelovém vzorku

H_1 : Antioxidační aktivita naměřena pomocí metody FRAP v modelovém vzorku je závislá na koncentraci rutinu v modelovém vzorku

Obrázek 21: Ověření normality dat u antioxidační metody FRAP a koncentraci rutinu v modelovém vzorku



Obrázek 22: Ověření nulové hypotézy o nezávislosti antioxidační metody FRAP na koncentraci rutinu v modelovém vzorku

Proměnná	Korelace (Tabulka1)	
	Prom1	Prom2
Prom1	1,0000	-,0968
	p= ---	p=,685
Prom2	-,0968	1,0000
	p=,685	p= ---

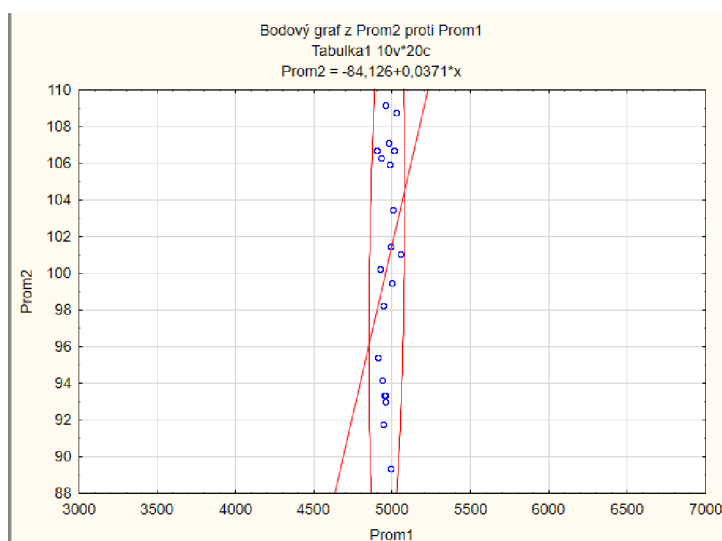
Závěr: p-value = 0,685 > 0,05 hypotézu H_0 nezamítá. Korelační analýza neprokázala, že výsledky obou testů na sobě závisí.

6.7 Závislost L-askorbové kyseliny na DPPH

H_0 : Antioxidační aktivita naměřena pomocí metody DPPH v modelovém vzorku je nezávislá na koncentrace L-askorbové kyseliny v modelovém vzorku

H_1 : Antioxidační aktivita naměřena pomocí metody DPPH v modelovém vzorku je závislá na koncentrace L-askorbové kyseliny v modelovém vzorku

Obrázek 23: Ověření normality dat u antioxidační metody DPPH a koncentraci L-askorbové kyseliny v modelovém vzorku



Obrázek 24: Ověření nulové hypotézy o nezávislosti antioxidační metody DPPH na koncentraci L-askorbové kyseliny v modelovém vzorku

Proměnná	Korelace (Tabulka1)	
	Prom1	Prom2
Prom1	1,0000	,2379
	p= ---	p=,313
Prom2	,2379	1,0000
	p=,313	p= ---

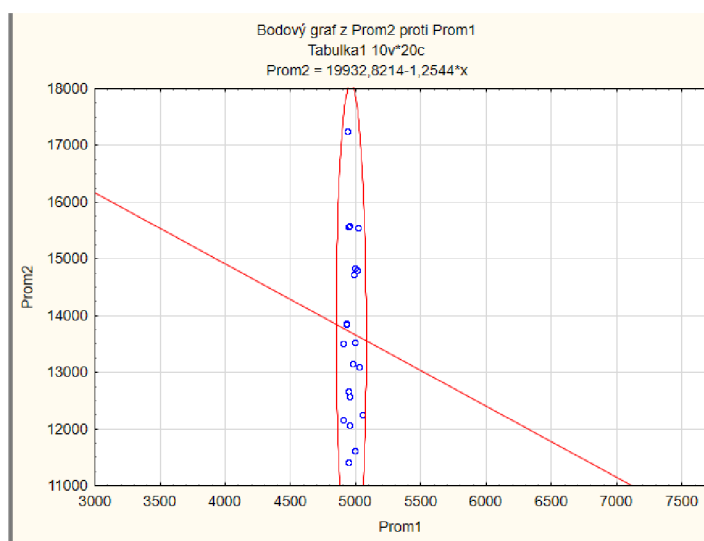
Závěr: p-value = 0,313 > 0,05 hypotézu H_0 nezamítá. Korelační analýza neprokázala, že výsledky obou testů na sobě závisí.

6.8 Závislost L-askorbové kyseliny na ABTS

H_0 : Antioxidační aktivita naměřena pomocí metody ABTS v modelovém vzorku je nezávislá na koncentraci L-askorbové kyseliny v modelovém vzorku

H_1 : Antioxidační aktivita naměřena pomocí metody DPPH v modelovém vzorku je závislá na koncentraci L-askorbové kyseliny v modelovém vzorku

Obrázek 25: Ověření normality dat u antioxidační metody ABTS a koncentraci L-askorbové kyseliny v modelovém vzorku



Obrázek 26: Ověření nulové hypotézy o nezávislosti antioxidační metody ABTS na koncentraci L-askorbové kyseliny v modelovém vzorku

Proměnná	Korelace (Tabulka1)	
	Prom1	Prom2
Prom1	1,0000	-,0327
	p= ---	p=,891
Prom2	-,0327	1,0000
	p=,891	p= ---

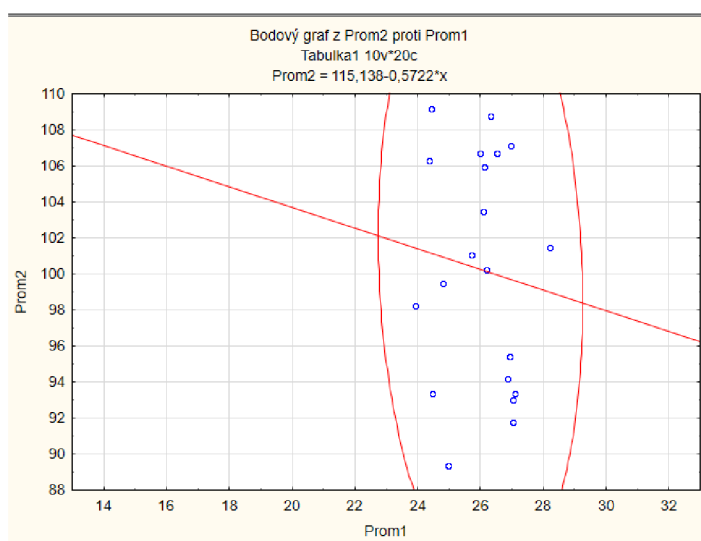
Závěr: p-value = 0,891 > 0,05 hypotézu H_0 nezamítá. Korelační analýza neprokázala, že výsledky obou testů na sobě závisí.

6.9 Závislost chlorogenové kyseliny na DPPH

H_0 : Antioxidační aktivita naměřena pomocí metody DPPH v modelovém vzorku je nezávislá na koncentraci chlorogenové kyseliny v modelovém vzorku

H_1 : Antioxidační aktivita naměřena pomocí metody DPPH v modelovém vzorku je závislá na koncentraci chlorogenové kyseliny v modelovém vzorku

Obrázek 27: Ověření normality dat u antioxidační metody DPPH a koncentrace chlorogenové kyseliny v modelovém vzorku



Obrázek 28: Ověření nulové hypotézy o nezávislosti antioxidační metody DPPH na koncentraci chlorogenové kyseliny v modelovém vzorku

		Korelace (Tabulka1)	
		Označ. korelace jsou významné na hlad. $p < ,05000$	
		N=20 (Celé případy vynechány u ChD)	
Proměnná		Prom1	Prom2
Prom1		1,0000	-,1044
		p=---	p=,661
Prom2		-,1044	1,0000
		p=,661	p=---

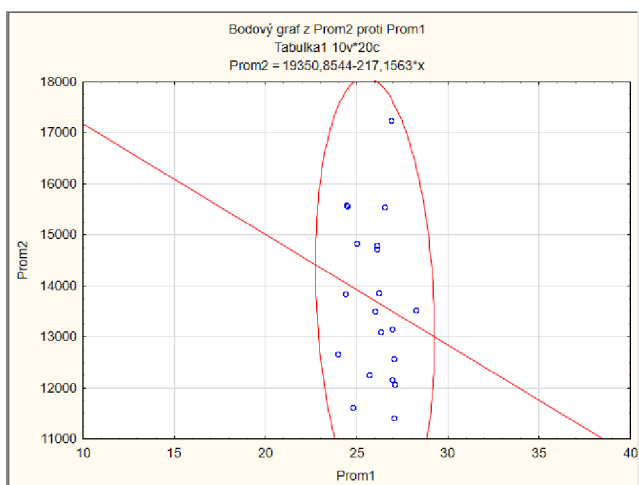
Závěr: $p\text{-value} = 0,661 > 0,05$ hypotézu H_0 nezamítá. Korelační analýza neprokázala, že výsledky obou testů na sobě závisí.

6.10 Závislost chlorogenové kyseliny na ABTS

H_0 : Antioxidační aktivita naměřena pomocí metody ABTS v modelovém vzorku je nezávislá na koncentraci chlorogenové kyseliny v modelovém vzorku

H_1 : Antioxidační aktivita naměřena pomocí metody ABTS v modelovém vzorku je závislá na koncentraci chlorogenové kyseliny v modelovém vzorku

Obrázek 29: Ověření normality dat u antioxidační metody ABTS a koncentrace chlorogenové kyseliny v modelovém vzorku



Obrázek 30: Ověření nulové hypotézy o nezávislosti antioxidační metody ABTS na koncentraci chlorogenové kyseliny v modelovém vzorku

		Korelace (Tabulka1)	
		Označ. korelace jsou významné na hlad. $p < ,05000$	
		N=20 (Celé případy vynechány u ChD)	
Proměnná		Prom1	Prom2
Prom1		1,0000	-,1614
		p= ---	p=,497
Prom2		-,1614	1,0000
		p=,497	p= ---

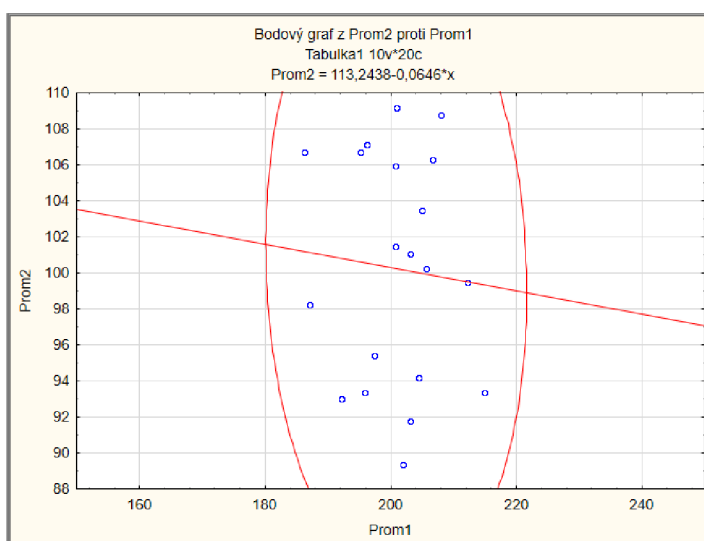
Závěr: $p\text{-value} = 0,497 > 0,05$ hypotézu H_0 nezamítá. Korelační analýza neprokázala, že výsledky obou testů na sobě závisí.

6.11 Závislost rutinu na DPPH

H_0 : Antioxidační aktivita naměřena pomocí metody DPPH v modelovém vzorku je nezávislá na koncentraci rutinu v modelovém vzorku

H_1 : Antioxidační aktivita naměřena pomocí metody DPPH v modelovém vzorku je závislá na koncentraci rutinu v modelovém vzorku

Obrázek 31: Ověření normality dat u antioxidační metody DPPH a koncentrace rutinu v modelovém vzorku



Obrázek 32: Ověření nulové hypotézy o nezávislosti antioxidační metody DPPH na koncentraci rutinu v modelovém vzorku

Proměnná	Korelace (Tabulka1)	
	Prom1	Prom2
Prom1	1,0000	-,0753
	p= ---	p=,752
Prom2	-,0753	1,0000
	p=,752	p= ---

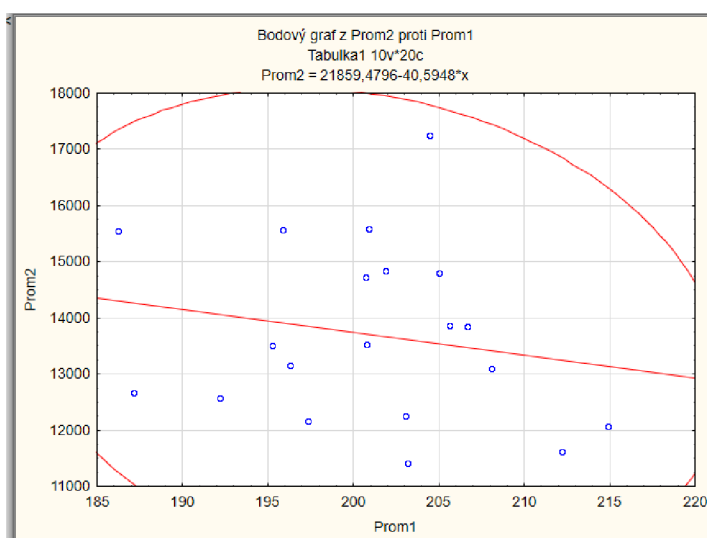
Závěr: p-value = 0,752 > 0,05 hypotézu H_0 nezamítá. Korelační analýza neprokázala, že výsledky obou testů na sobě závisí.

6.12 Závislost rutinu na ABTS

H_0 : Antioxidační aktivita naměřena pomocí metody ABTS v modelovém vzorku je nezávislá na koncentraci rutinu v modelovém vzorku

H_1 : Antioxidační aktivita naměřena pomocí metody ABTS v modelovém vzorku je závislá na koncentraci rutinu v modelovém vzorku

Obrázek 33: Ověření normality dat u antioxidační metody ABTS a koncentraci rutinu v modelovém vzorku



Obrázek 34: Ověření nulové hypotézy o nezávislosti antioxidační metody ABTS na koncentraci rutinu v modelovém vzorku

Proměnná	Korelace (Tabulka1)	
	Prom1	Prom2
Prom1	1,0000	-,1928
	p= ---	p=,416
Prom2	-,1928	1,0000
	p=,416	p= ---

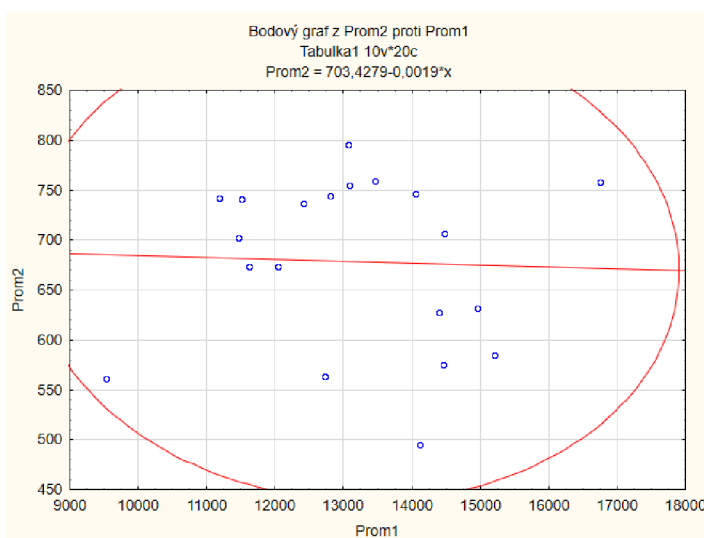
Závěr: p-value = 0,416 > 0,05 hypotézu H_0 nezamítá. Korelační analýza neprokázala, že výsledky obou testů na sobě závisí.

6.13 Závislost FRAP na TPP

H_0 : Antioxidační aktivita naměřena pomocí metody FRAP v modelovém vzorku je nezávislá na koncentraci celkových polyfenolů v modelovém vzorku

H_1 : Antioxidační aktivita naměřena pomocí metody FRAP v modelovém vzorku je závislá na koncentraci celkových polyfenolů v modelovém vzorku

Obrázek 35: Ověření normality dat u antioxidační metody FRAP a koncentraci celkových polyfenolů v modelovém vzorku



Obrázek 36: Ověření nulové hypotézy o nezávislosti antioxidační metody FRAP na koncentraci celkových polyfenolů v modelovém vzorku

Proměnná	Korelace (Tabulka1)	
	Prom1	Prom2
Prom1	1,0000	-,0371
	p= ---	p= ,877
Prom2	-,0371	1,0000
	p= ,877	p= ---

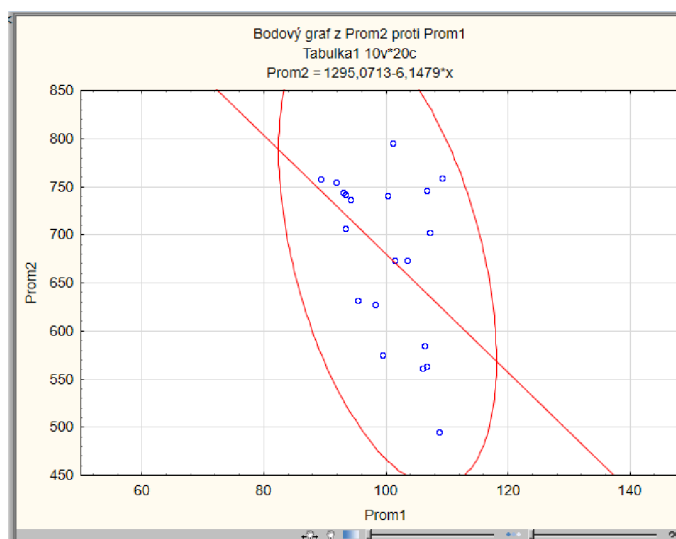
Závěr: p-value = 0,877 > 0,05 hypotézu H_0 nezamítá. Korelační analýza neprokázala, že výsledky obou testů na sobě závisí.

6.14 závislost DPPH na TPP

H_0 : Antioxidační aktivita naměřena pomocí metody DPPH v modelovém vzorku je nezávislá na koncentraci celkových polyfenolů v modelovém vzorku

H_1 : Antioxidační aktivita naměřena pomocí metody DPPH v modelovém vzorku je závislá na koncentraci celkových polyfenolů v modelovém vzorku

Obrázek 37: Ověření normality dat u antioxidační metody DPPH a koncentraci celkových polyfenolů v modelovém vzorku



Obrázek 38: Ověření nulové hypotézy o nezávislosti antioxidační metody DPPH na koncentraci celkových polyfenolů v modelovém vzorku

Proměnná	Korelace (Tabulka1)	
	Prom1	Prom2
Prom1	1,0000	-,4571
	p= ---	p= ,043
Prom2	-,4571	1,0000
	p= ,043	p= ---

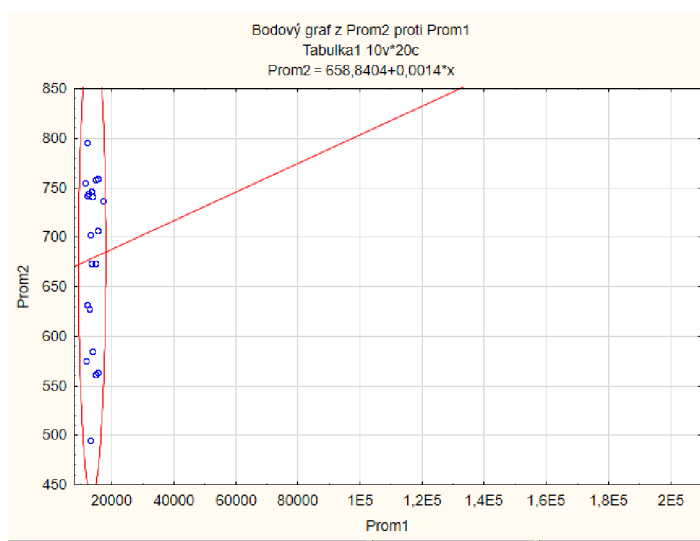
Závěr: p-value = 0,043 > 0,05 hypotézu H_0 zamítá. Korelační analýza prokázala, že výsledky obou testů na sobě závisí.

6.15 závislost ABTS na TPP

H_0 : Antioxidační aktivita naměřena pomocí metody ABTS v modelovém vzorku je nezávislá na koncentraci celkových polyfenolů v modelovém vzorku

H_1 : Antioxidační aktivita naměřena pomocí metody ABTS v modelovém vzorku je závislá na koncentraci celkových polyfenolů v modelovém vzorku

Obrázek 39: Ověření normality dat u antioxidační metody ABTS a koncentraci celkových polyfenolů v modelovém vzorku



Obrázek 40: Ověření nulové hypotézy o nezávislosti antioxidační metody ABTS na koncentraci celkových polyfenolů v modelovém vzorku

Proměnná	Korelace (Tabulka1)	
	Prom1	Prom2
Prom1	1,0000	,0264
	p= ---	p=,912
Prom2	,0264	1,0000
	p=,912	p= ---

Závěr: p-value = 0,912 > 0,05 hypotézu H_0 nezamítá. Korelační analýza neprokázala, že výsledky obou testů na sobě závisí.

6.16 Souhrnná statistika

Tabulka 15: Souhrnné výsledky korelační analýzy

	FRAP	DPPH	ABTS
Chlorogenová kyselina	0,010	0,661	0,497
Rutin	0,685	0,752	0,416
Anthokyany	0,194	0,267	0,719
L-askorbová kyselina	0,535	0,313	0,891
Celkové polyfenoly	0,877	0,043	0,912

V tabulce č. 14 jsou shrnuty výsledky korelační analýzy a zároveň červenou barvou vyznačeny závislé parametry. Nejvyšší korelace byla stanovena mezi koncentrací chlorogenové kyseliny a antioxidační aktivitou, která byla stanovena metodou FRAP v modelovém vzorku. O něco nižší korelace byla zaznamenána také mezi koncentrací celkových polyfenolů a antioxidační aktivitou naměřenou pomocí metody DPPD v modelovém vzorku.

7 Závěr

Cílem mé diplomové práce bylo stanovit základní biologicky aktivní komponenty obsažené v modelovém vzorku (sirup z plodů bezu černého). Následně stanovit antioxidační aktivitu pomocí tří odlišných metod.

V literární rešerši jsem se zabývala teorií, kde je popsána charakteristika botanického druhu, látky, které jsou v bezu černém obsaženy a jejich charakteristikami. Krátce jsem věnovala pozornost jednotlivým metodám, které jsem následně využila v praktické části.

Biologický materiál, který jsem použila, byl nasbíráán z volně rostoucích keřů. Stanovení hlavních komponent probíhalo na katedře aplikované chemie na Fakultě zemědělské a technologické. Stanovení antioxidační aktivity probíhalo na katedře rostlinné výroby na Fakultě zemědělské a technologické.

Obsahy jednotlivých hlavních komponent se výrazně lišily. Nejvyšší obsah byl naměřen u L-askorbové kyseliny 4970 mg/kg, následně obsah anthokyanů 2160 mg/kg, obsah celkových fenolů 679 mg/l, obsah rutinu 201 mg/kg, nejnižší obsah nad mírou stanovení byl stanoven u chlorogenové kyseliny 26 mg/kg. Kvercetin nebyl v modelovém vzorku obsažen vůbec.

Na základně diskuze se prokázalo, že na většinu hlavních komponent má negativní vliv doba i podmínky skladování a následné zpracování biologického materiálu. Statistické vyhodnocení ukázalo, že koreluje stanovení chlorogenové kyseliny s antioxidační aktivitou měřenou pomocí metody FRAP a obsah celkových polyfenolů s antioxidační aktivitou naměřenou pomocí metody DPPH.

V diskuzi naměřené hodnoty nekorespondují s ostatními studii. Tyto odlišnosti jsou způsobeny porovnáváním různých druhů produktů, které jsou tvořeny odlišným ovocem. Různou tepelnou úpravou při zpracování produktů. Odlišným složením jednotlivých šťáv a džusů. Velmi velký vliv na naměřená data má i stáří použitého ovoce pro výrobu jednotlivých produktů.

8 Seznam literatury

Abdel-Shafy, H., Mansour, M. (2017). *Polyphenols: Properties, Occurrence, Content in Food and Potential Effects* (s. 232–261).

Blainski, A., Lopes, G., & de Mello, J. (2013). Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules*, 18(6), 6852–6865.

Blois, M. (1958). Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, (181), 1999–2000.

Codoñer-Franch, P., López-Jaén, A. B., Muñiz, P., Sentandreu, E., Bellés, V. V. (2008). Mandarin Juice Improves the Antioxidant Status of Hypercholesterolemic Children. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition*, 47(3), 349–355.

<https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e31816a8cdb>

Cooke, D., Steward, W.P., Gescher, A.J., Marczylo, T., (2005). Anthocyanins from fruits and vegetables – Does bright colour signal cancer chemopreventive activity? *European Journal of Cancer*, 41, 1931–1940.

Cvetkovic, B., Malbasa, R., Loncar, E., Njezic, Z., Simurina, O., Filipcev, B., Tepic, A. (2012). The comparison of techniques and methods for L-ascorbic acid determination in the fruits. *Hemijska Industrija*, 66(4), 553–558.

<https://doi.org/10.2298/HEMIND111020016C>

Dadáková, E., Kalinová, J. (2010). Determination of quercetin glycosides and free quercetin in buckwheat by capillary micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Separation Science*, 33(11), 1633–1638.

<https://doi.org/10.1002/jssc.200900809>

Domínguez, R., Zhang, L., Rocchetti, G., Lucini, L., Pateiro, M., Munekata, P.E.S. (2020) Elderberry (*Sambucus nigra* L.) as potential source of antioxidants. Characterization, optimization of extraction parameters and bioactive properties. *Food Chemistry*. (330).

Du, X., & Myracle, A. D. (2018). Development and evaluation of kefir products made with aronia or elderberry juice: sensory and phytochemical characteristics. *International Food Research Journal*, 25(4).

En-Nakra, F., Uzun, D., & Hasdemir, E. (2021). Voltammetric determination of rutin in fruit juice samples using a 2 mercaptobenzothiazole coated pencil graphite electrode. *Journal of Food Composition and Analysis*, *104*, 104183.

<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104183>

Garcia-Herrera, P., Pérez-Rodríguez, M.-L., Aguilera-Delgado, T., Labari-Reyes, M.-J., Olmedilla-Alonso, B., Camara, M., & de Pascual-Teresa, S. (2016). Anthocyanin profile of red fruits and black carrot juices, purees and concentrates by HPLC-DAD-ESI/MS-QTOF. *International Journal of Food Science & Technology*, *51*(10), 2290–2300. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13210>

Gil, M., Wianowska, D., (2017). Chlorogenic acids – their properties, occurrence and analysis. *Annales, UMCS, Chemia* *72*, 61–104.

Grau, J., Jung, R., Münker, B., (1996). *Bobulovitě, užítkové a léčivé rostliny*. 1. vydání. Praha: Knižní klub. 32-33 s. ISBN 80-7176-369-1

Jakobek, L., Seruga, M., Medvidovic-Kosanovic, M., & Novak, I. (2007). Anthocyanin content and antioxidant activity of various red fruit juices. *Deutsche Lebensmittelrundschau*, *103*(2), 58.

Juranović Cindrić, I., Kunšić, M., Zeiner, M., Stinger, G., & Rusak, G. (2011). Sample Preparation Methods for the Determination of the Antioxidative Capacity of Apple Juices. *Croatica Chemica Acta*, *84*(3), 435–438.

<https://doi.org/10.5562/cca1756>

Kabasakalis, V. (2000). Ascorbic acid content of commercial fruit juices and its rate of loss upon storage. *Food Chemistry*, *70*(3), 325–328.

[https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00093-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00093-5)

Kalinova, J., & Dadakova, E. (2009). Rutin and Total Quercetin Content in Amaranth (*Amaranthus* spp.). *Plant Foods for Human Nutrition*, *64*(1), 68–74. <https://doi.org/10.1007/s11130-008-0104-x>

Kalinová, J., Dadáková, E. (2013). Influence of sowing date and stand density on rutin level in buckwheat. *Cereal Research Communications*, 41(2), 348–358. <https://doi.org/10.1556/CRC.2012.0039>

Korbelář, J., Endris, Z., Krejča, J. (1973). *Naše rostliny v lékařství*. 4., rozšířené a zcela přepracované vydání. Praha. Avicenum, zdravotnické nakladatelství, s. 118-119.

Kratochvílová, L., 2020. Porovnání metod pro stanovení obsahu anthokyanů v plodech bezu černého [Bakalářská práce]. České Budějovice, Jihočeská univerzita, Fakulta pedagogická, Katedra aplikované chemie

Křížek, M., Šíma, J., (2015), *Analytická chemie*. 1. vydání. České Budějovice, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, s. 178-191. ISBN 978-80-7394-486-5

Laxová, L., (2017). Biologicky aktivní fenolické látky v drobném ovoci. [Diplomová práce]. České Budějovice, Jihočeská univerzita, Fakulta pedagogická, Katedra aplikované chemie, 57 s.

Memon, A. F., Solangi, A. R., Memon, S. Q., Mallah, A., Memon, N., & Memon, A. A. (2017). Simultaneous Determination of Quercetin, Rutin, Naringin, and Naringenin in Different Fruits by Capillary Zone Electrophoresis. *Food Analytical Methods*, 10(1), 83–91. <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0552-0>

Nabavi, S.M., Silva, A.S., (2019). *Nonvitamin and nonmineral nutritional supplements*. 1. vydání. Waltham, MA, Elsevier s. 583. ISBN 9780128124918

Netzel, M., Strass, G., Kaul, C., Bitsch, I., Dietrich, H., & Bitsch, R. (2002). In vivo antioxidative capacity of a composite berry juice. *Food Research International*, 35(2–3), 213–216. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00186-7](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00186-7)

Neves, C. M. B., Pinto, A., Gonçalves, F., & Wessel, D. F. (2021). Changes in Elderberry (*Sambucus nigra* L.) Juice Concentrate Polyphenols during Storage. *Applied Sciences*, 11(15), 6941. <https://doi.org/10.3390/app11156941>

Nowak, D., Gośliński, M., & Szwengiel, A. (2017). Multidimensional comparative analysis of phenolic compounds in organic juices with high antioxidant

capacity: Phenolic compounds of organic juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(8), 2657–2663. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8089>

Ozgen, S., Kilinc, O.K., Selamoglu, Z., (2016). Antioxidant activity of quercetin: A mechanistic review. *TURJAF* 4, 1134–1138.

Paulová, H., Bochořáková, H., Táborská, E., (2004). Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chem. Listy*, 98, 174–179.

Pliszka, B. (2017). Polyphenolic content, antiradical activity, stability and microbiological quality of elderberry (*Sambucus nigra* L.) extracts [pdf]. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 16(4), 393–401. <https://doi.org/10.17306/J.AFS.2017.0523>

Sadilova, E., Stintzing, F. C., Kammerer, D. R., Carle, R. (2009). Matrix dependent impact of sugar and ascorbic acid addition on color and anthocyanin stability of black carrot, elderberry and strawberry single strength and from concentrate juices upon thermal treatment. *Food Research International*, 42(8), 1023–1033. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.04.008>

Scarano, A., Chieppa, M., Santino, A. (2020). Plant Polyphenols-Biofortified Foods as a Novel Tool for the Prevention of Human Gut Diseases. *Antioxidants*, 9(12), 1225. <https://doi.org/10.3390/antiox9121225>

Shilpi, S., Shivvedi, R., Singh, A., Kumar, A., Saraogi, G.K., Jain, V., Khatri, K., (2018). Vitamin-C: properties, function and application in cancer therapy. *Journal of Cancer Prevention and Current Research* 9, 331–334.

Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., Crouch, S.R., (2019). *Analytická chemie*. 1. vydání. Praha, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, s. 601-604. ISBN 978-80-7592-043-0

Štulík, K., a kol., (2005). *Analytické separační metody*. 1. vydání. Praha, Karolinum, s. 94-171. ISBN 80-246-0852-9

Varming, C., Petersen, M. A., & Toldam-Andersen, T. B. (2013). Ascorbic acid contents in Danish apple cultivars and commercial apple juices. *LWT - Food Science and Technology*, 54(2), 597–599. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.06.024>

Veberic, R., Jakopic, J., Stampar, F., Schmitzer, V. (2009). European elderberry (*Sambucus nigra* L.) rich in sugars, organic acids, anthocyanins and selected polyphenols. *Food Chemistry*, 114(2), 511–515.

Velíšek, J., Hajšlová, J., (2009). *Chemie potravin II*. 3. vydání. Tábor, OSSIS, s. 601-604. ISBN 978-80-86659-16-9

Vrchotová, N., Dadáková, E., Matějček, A., Tříška, J., & Kaplan, J. (2017). Effect of variety on content of bioactive phenolic compounds in common elder (*Sambucus nigra* L.). *Natural Product Research*, 31(6), 700–703. <https://doi.org/10.1080/14786419.2016.1214826>

Vulic, J., Vracar, L., Sumic, Z. (2008). Chemical characteristics of cultivated elderberry fruit. *Acta Periodica Technologica*, 39, 85–90.

Watson, R.R., Preedy, V.R., Zibadi, S., (2014). *Polyphenols in human health and disease*. 1. vydání. Boston, Academic Press, s. 9-15. ISBN 0123984564

Wern, K., Haron, H., & Keng, C. (2016). Comparison of Total Phenolic Contents (TPC) and Antioxidant Activities of Fresh Fruit Juices, Commercial 100% Fruit Juices and Fruit Drinks. *SAINS MALAYSIANA*, 45(9), 1319–1327.

ZDRAVOTNICTVÍ ČR MINISTERSTVO, (2017). *Český lékopis 2017*. 1. vydání. Praha, Grada, s. 4904. ISBN 859-404-924-045-6

9 Seznam obrázků

Obrázek 1: Základní struktura anthokyanů (Velíšek a Hajšlová, 2009).....	14
Obrázek 2: Redukovaná forma L-askorbové kyseliny.....	16
Obrázek 3: Oxidovaná forma L-askorbové kyseliny.....	17
Obrázek 4: Chemická struktura rutinu.....	18
Obrázek 5: Chemická struktura kvercetinu.....	22
Obrázek 6: Chemická struktura chlorogenové kyseliny.....	23
Obrázek 7: Schéma kapalinového chromatografu (Křížek a Šíma 2015).....	25
Obrázek 8: Kalibrační křivka pro L-askorbovou kyselinu s rovnicí regrese.....	33
Obrázek 9: Kalibrační křivka pro rutin s rovnicí regrese.....	35
Obrázek 10: Kalibrační křivka pro chlorogenovou kyselinu s rovnicí regrese.....	36
Obrázek 11: Ověření normality dat u antioxidační metody FRAP a koncentraci anthokyanů v modelovém vzorku.....	61
Obrázek 12: Ověření nulové hypotézy o nezávislosti antioxidační metody FRAP na koncentraci anthokyanů v modelovém vzorku.....	61
Obrázek 13: Ověření normality dat u antioxidační metody DPPH a koncentraci anthokyanů v modelovém vzorku.....	62
Obrázek 14: Ověření nulové hypotézy o nezávislosti antioxidační metody DPPH na koncentraci anthokyanů v modelovém vzorku.....	62
Obrázek 15: Ověření normality dat u antioxidační metody ABTS a koncentraci anthokyanů v modelovém vzorku.....	63
Obrázek 16: Ověření nulové hypotézy o nezávislosti antioxidační metody ABTS na koncentraci anthokyanů v modelovém vzorku.....	63
Obrázek 17: Ověření normality dat u antioxidační metody FRAP a koncentraci L-askorbové kyseliny v modelovém vzorku.....	64
Obrázek 18: Ověření nulové hypotézy o nezávislosti antioxidační metody FRAP na koncentraci L-askorbové kyseliny v modelovém vzorku.....	64
Obrázek 19: Ověření normality dat u antioxidační metody FRAP a koncentraci chlorogenové kyseliny v modelovém vzorku.....	65
Obrázek 20: Ověření nulové hypotézy o nezávislosti antioxidační metody FRAP na koncentraci chlorogenové kyseliny v modelovém vzorku.....	65
Obrázek 21: Ověření normality dat u antioxidační metody FRAP a koncentraci rutinu v modelovém vzorku.....	66

Obrázek 22: Ověření nulové hypotézy o nezávislosti antioxidační metody FRAP na koncentraci rutinu v modelovém vzorku.....	66
Obrázek 23:Ověření normality dat u antioxidační metody DPPH a koncentraci L-askorbové kyseliny v modelovém vzorku.....	67
Obrázek 24: Ověření nulové hypotézy o nezávislosti antioxidační metody DPPH na koncentraci L-askorbové kyseliny v modelovém vzorku	67
Obrázek 25:Ověření normality dat u antioxidační metody ABTS a koncentraci L-askorbové kyseliny v modelovém vzorku.....	68
Obrázek 26: Ověření nulové hypotézy o nezávislosti antioxidační metody ABTS na koncentraci L-askorbové kyseliny v modelovém vzorku	68
Obrázek 27:Ověření normality dat u antioxidační metody DPPH a koncentrace chlorogenové kyseliny v modelovém vzorku	69
Obrázek 28: Ověření nulové hypotézy o nezávislosti antioxidační metody DPPH na koncentraci chlorogenové kyseliny v modelovém vzorku.....	69
Obrázek 29:Ověření normality dat u antioxidační metody ABTS a koncentrace chlorogenové kyseliny v modelovém vzorku	70
Obrázek 30: Ověření nulové hypotézy o nezávislosti antioxidační metody ABTS na koncentraci chlorogenové kyseliny v modelovém vzorku.....	70
Obrázek 31: Ověření normality dat u antioxidační metody DPPH a koncentrace rutinu v modelovém vzorku.....	71
Obrázek 32: Ověření nulové hypotézy o nezávislosti antioxidační metody DPPH na koncentraci rutinu v modelovém vzorku.....	71
Obrázek 33: Ověření normality dat u antioxidační metody ABTS a koncentraci rutinu v modelovém vzorku.....	72
Obrázek 34: Ověření nulové hypotézy o nezávislosti antioxidační metody ABTS na koncentraci rutinu v modelovém vzorku.....	72
Obrázek 35: Ověření normality dat u antioxidační metody FRAP a koncentraci celkových polyfenolů v modelovém vzorku	73
Obrázek 36: Ověření nulové hypotézy o nezávislosti antioxidační metody FRAP na koncentraci celkových polyfenolů v modelovém vzorku	73
Obrázek 37: Ověření normality dat u antioxidační metody DPPH a koncentraci celkových polyfenolů v modelovém vzorku	74

Obrázek 38: Ověření nulové hypotézy o nezávislosti antioxidační metody DPPH na koncentraci celkových polyfenolů v modelovém vzorku	74
Obrázek 39: Ověření normality dat u antioxidační metody ABTS a koncentraci celkových polyfenolů v modelovém vzorku	75
Obrázek 40: Ověření nulové hypotézy o nezávislosti antioxidační metody ABTS na koncentraci celkových polyfenolů v modelovém vzorku	75

10 Seznam tabulek

Tabulka 1: Obsah rutinu v daných rostlinách a jejich částech (Nabavi a Silva, 2019; Kalinová a Dadáková, 2013).....	19
Tabulka 2: Obsah kvercetinu v rostlinách (Nabavi a Silva, 2019)	21
Tabulka 3: Kalibrační řada pro L-askorbovou kyselinu	32
Tabulka 4: Kalibrační řada pro rutin	34
Tabulka 5: Kalibrační řada pro chlorogenovou kyselinu	35
Tabulka 6: Obsah anthokyanů.....	39
Tabulka 7: Obsah L-askorbové kyseliny	42
Tabulka 8: Obsah celkových polyfenolů vyjádřen jako ekvivalent L-askorbové kyseliny	44
Tabulka 9: Obsah rutinu.....	47
Tabulka 10: Obsah chlorogenové kyseliny	49
Tabulka 11: Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH vyjádřené jako ekvivalent L-askorbové kyseliny	50
Tabulka 12: Stanovení antioxidační aktivity metodou FRAP vyjádřené jako ekvivalent L-askorbové kyseliny	53
Tabulka 13: Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS vyjádřené jako ekvivalent L-askorbové kyseliny	56
Tabulka 14: Souhrnné zobrazení obsahu stanovovaných obsahových látek v modelovém vzorku.....	59
Tabulka 15: Souhrnné výsledky korelační analýzy	76