

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta
Katedra laboratorních metod a informačních systémů

Bakalářská práce

Stabilita biologicky aktivních látek květenství
bezu černého (*Sambucus nigra* L.) při
zpracování

Vypracovala: Renata Suchá

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

České Budějovice 2014

Abstrakt

Práce se zabývá problematikou stability rutinu v květenství bezu černého při zpracování.

Bez černý (*Sambucus nigra* L.) je léčivá bylina, která se k medicínským účelům používala již ve středověku. Květy (*Flos Sambuci*) a plody (*Fructus Sambuci*) jsou na seznamu oficiálních léčivých přípravků Státního ústavu pro kontrolu léčiv. Hlavní jeho účinnou fenolickou látkou je flavonoid rutin.

Černý bez je listnatý keř někdy strom, který roste na slunných místech. Patří do čeledi zimolezovitých (*Caprifoliaceae*). Malé a bělavé květy tvoří bohatá soukvětí, která mají v době květu velmi intenzivní vůni. Jeho plody jsou malé červenofialové až černé peckovice.

Flavonoidy jsou fenolické látky rostlinného původu. V posledních letech roste zájem o studium těchto biologicky aktivních látek, protože mají pozitivní účinky na lidský organismus. Hlavními zdroji těchto látek jsou ovoce, zelenina a léčivé byliny.

Jejich nejznámější vlastností je antioxidační působení. Chrání krevní lipoproteiny o nízké hustotě před oxidační modifikací, která je příčinou rozvoje aterosklerózy a hypertenze. Regulují hladinu cholesterolu v krvi. Působí proti vzniku krevních sraženin a tím pomáhají předcházet infarktu myokardu a mozkové mrtvici. Mají pozitivní účinky na elasticitu cév, snižují jejich fragilitu. Také posilují imunitní systém. Rovněž mají antikarcinogenní vlastnosti. Umějí blokovat iniciaci nádorového procesu, zastavit buněčný cyklus a indukovat buněčnou smrt přednostně v rakoviných buňkách. Těmito mechanismy chrání organismus před některými formami rakoviny, především před rakovinou plic, trávicího traktu, prsu a prostaty. Vykazují řadu dalších biologických účinků jako např. antialergické, antibakteriální, antivirové a protizánětlivé. Konzumace ovoce a zeleniny obohacuje stravu o biologicky cenné látky. Podle doporučení WHO bychom měli denně zkonzumovat 400 g ovoce a zeleniny. Dalším zdrojem výživově cenných sloučenin mohou být léčivky.

Bez černý jako léčivka se požívá hlavně pro přípravu léčivého nápoje. Znamé je také jeho využití jako materiálu pro přípravu sirupu. Tento výrobek poskytuje osvěžující a chutný nápoj a v poslední době se objevuje i v obchodní síti.

Pro srovnání bylo v obchodní síti pořízeno pět jednodruhových sirupů z květů bezu černého, vyrobených různými výrobci. Byl navržen postup přípravy sirupu z bezového květu, který vycházel jednak z mraženého květenství bezu, jednak ze sušeného květenství. Rostlinný materiál pocházel z volně rostoucích keřů a byl pořízen v červnu 2013.

V laboratoři bylo připraveno celkem osm sirupů, čtyři z čerstvého materiálu a čtyři ze sušeného. Byly použity dva postupy. Prvním postupem byla extrakce cukerným roztokem, druhým postupem extrakce vodným roztokem, kam byl cukr přidán až posléze. Další přidávanou látkou byl ethanol.

Metoda stanovení rutinu ve vzorcích spočívala v kombinaci dvou extrakčních kroků. Prvním krokem byla klasická extrakce vodným methanolem a druhým krokem extrakce pevným sorbentem (SPE).

Měření všech vzorků bylo provedeno na kapalinovém chromatografu Agilent 1200 Series Rapid Resolution LC System (Agilent Technologies, USA). Pro vyhodnocení a zpracování výsledků byly použity programy ChemStation 3D (Agilent Technologies) a MS Office Excel (Microsoft).

Analýzou čerstvého a sušeného materiálu bylo zjištěno, že sušené květy bezu černého obsahují mnohonásobně více rutinu než čerstvý černý bez. Z komerčně vyráběných sirupů nejvíce rutinu obsahoval Kitl Syrob Bezový, o něco méně Hamé Bylinný sirup Bezový květ. Koncentrace rutinu v sirupech připravených v laboratoři byla daleko vyšší v porovnání s komerčními produkty. Rozdílnými způsoby přípravy sirupů a následnou analýzou bylo zjištěno, že sirupy připravené ze sušeného květenství obsahují větší množství rutinu, než sirupy vyrobené stejným postupem, ale z materiálu mraženého. Přídavek malého množství etanolu neměl na extrakci rutinu z květenství vliv. V žádném z připravených sirupů se neobjevil volný kvercetin, který by svědčil o rozkladu rutinu.

Připravené sirupy byly použity k přípravě nápoje a použity pro senzoricou analýzu. Výsledky párového preferenčního oboustranného testu ukázaly, že u předložených dvojic nápoje tvořených vždy výrobkem z čerstvého a sušeného bezu hodnotitelé preferovali ve dvou případech sirupy ze sušených květů černého bezu a u dvou posuzovaných párů výsledky nebyly statisticky prokazatelné. Ve všech případech posuzovatelé nejčastěji vnímali malé a střední rozdíly.

Ze získaných výsledků plyne, že nejlepší způsob přípravy sirupu je s použitím sušeného rostlinného materiálu a sacharózového roztoku jako extrakčního činidla. Takto připravený sirup obsahoval nejvíce rutin a zároveň vykazoval nejmenší ztráty této zdraví prospěšné látky. Navíc v porovnání se stejně připraveným sirupem z čerstvého materiálu lépe chutnal.

Klíčová slova:

černý bez, flavonoidy, rutin, vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Abstract

This thesis examines the stability of rutin in the inflorescences of the elder during processing.

Elder (*Sambucus nigra* L.) is a medicinal plant that was used for medical purposes as early as in the Middle Ages. Both flowers (*Flos Sambuci*) and fruit (*Fructus Sambuci*) of the elder are on the list of official medicinal products of the State Institute for Drug Control. The main active phenolic substance is flavonoid rutin.

The elder is a deciduous shrub, sometimes a tree, which grows in sunny places. It belongs to the honeysuckle family (*Caprifoliaceae*). Its small and ivory white flowers create rich inflorescences with a very intensive smell during the blossoming period. Its fruit is small purple-black to black drupes.

Flavonoids are phenolic substances of plant origin. In recent years, there has been an increased interest in the study of these biologically active substances because of their positive influence on the human organism. The main sources of these substances are fruit, vegetables and medicinal plants.

Among the best known properties of these substances is their antioxidant activity. They protect the low density blood lipoproteins from the oxidation modifications that cause the development of arteriosclerosis and hypertension; they regulate the level of cholesterol in the blood; and they act against the creation of blood clots, thus helping to prevent myocardial infarction and stroke. They have positive influence on the elasticity of veins and decrease their fragility and they also strengthen the immune system. Furthermore, they act as anticarcinogens. They can block the initiation of the tumour process, stop the cell cycle and induce cell death preferentially in cancer cells. Thanks to these mechanisms, they protect the organism from some forms of cancer, especially lung cancer, cancer of the digestive tract and breast and prostate cancer. They show many other biological effects, including anti-allergic, antibacterial, antiviral and anti-inflammatory effects. Fruit and vegetable consumption enrich food with biologically valuable components. According to a WHO recommendation, everyone should eat

400 g of fruit and vegetables per day. Another source of nutritionally valuable components could be medical plants.

As a medical plant, the elder is used especially for the preparation of a medicinal drink. It is also commonly used as a material for the preparation of syrup. This product serves as a basis for a refreshing and tasty drink and lately it has also started to be sold in shops.

For comparison, five single-flower syrups from the elderflower by different producers were bought. A method of preparation of the elderflower syrup was devised, based in one case on frozen elder inflorescences and in the other on dried inflorescences. The plant material came from wildy growing shrubs and it was collected in June 2013.

Altogether, 8 syrups were prepared in the laboratory, 4 of them from fresh material and 4 from dried material. Two different methods were used. The first one was based on extraction using sugar solution, the second one on extraction using water solution where sugar was added afterwards. Another added substance was ethanol.

The method for measuring the amount of rutin in the samples was a combination of two extraction steps. The first step was the usual extraction using aqueous methanol and the second step was extraction using a solid sorbent (SPE).

The measurement of all samples was done on the Agilent 1200 Series Rapid Resolution LC System liquid chromatograph (Agilent Technologies, USA). For the evaluation and processing of the results, the ChemStation 3D (Agilent Technologies) and MS Office Excel (Microsoft) programmes were used.

The analysis of fresh and dried material concluded that dried elderflowers contain many times more rutin than fresh elder. Among the commercially produced syrups, the “Kitl Syrob Bezový” contained most rutin; a little less rutin was found in “Hamé Bylinný sirup Bezový květ”. The concentration of rutin in the syrups prepared in the laboratory was much higher than in the commercial products. By using different methods of syrup preparation and their subsequent analysis, it was found that the syrups prepared from the dried inflorescences contained a higher amount of rutin than the syrups produced in the same way, but from frozen material. Addition of a small amount

of ethanol had no effect on extraction of rutin from inflorescences. Free quercetin, which indicate a decomposition of rutin, wasn't found in any of produced syrups.

The produced syrups were used for the preparation of a drink and then underwent sensory analysis. The paired two-sided preference test included pairs of drinks consisting of a fresh elder drink and dried elder drink. The results showed that the evaluators preferred syrups from dried elderflowers in two of the cases, while in the other two evaluated pairs, the results were not statistically significant. In all cases, the evaluators most often found small and middle differences.

The gained results show that the best method of syrup preparation uses dried plant material and sucrose solution as the extraction agent. The syrup prepared in this way contained most rutin and at the same time showed the smallest losses of this substance, which is beneficial to human health. Furthermore, it also tasted better in comparison with syrup prepared in the same way, but from fresh material.

Key words:

elder, flavonoids, rutin, high-performance liquid chromatography

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci 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 bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich 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 (datum)

.....

Renata Suchá

Poděkování

Mé poděkování patří doc. Ing. Evě Dadákové, Ph.D., vedoucí mé bakalářské práce, za ochotu, odborné vedení a trpělivost při zpracování bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Tamaře Pelikánové za pomoc v laboratoři a doc. Ing. Evě Samkové, Ph.D. za pomoc při senzorické analýze. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mým rodičům za podporu během celého studia.

Obsah

Seznam použitých zkratek	13
Úvod.....	14
1 Teoretická část	16
1.1 Rostlinné fenolické látky.....	16
1.1.1 Skupiny rostlinných fenolů	16
1.1.2 Nejběžnější rostlinné fenoly	16
1.1.3 Fenolové kyseliny	16
1.1.4 Flavonoidy	17
1.1.5 Příjem polyfenolů z potravy	25
1.1.6 Fenolické látky a jejich význam	25
1.1.7 Vstřebávání a metabolismus fenolických látek	26
1.1.8 Biologické účinky flavonoidů.....	26
1.1.9 Kvercetin.....	28
1.2 Bez černý (Sambucus nigra L.).....	29
1.2.1 Obecné znaky.....	29
1.2.2 Výskyt.....	29
1.2.3 Obsažené látky	29
1.2.4 Použití v léčitelství.....	30
1.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	31

1.3.1	Principy separace látek v kapalinové chromatografii	32
1.3.2	Kvalitativní analýza	32
1.3.3	Kvantitativní analýza	32
1.3.4	Přístroje pro HPLC	33
1.4	Senzorická analýza.....	35
1.4.1	Smyslové vnímání.....	35
1.4.2	Párová porovnávací zkouška	35
2	Cíle práce a předpokládané hypotézy	36
3	Experimentální část.....	37
3.1	Chemikálie a standardy	37
3.2	Laboratorní sklo a přístroje	37
3.3	Materiál	38
3.4	Příprava sirupů z bezových květů	39
3.4.1	Extrakce cukerným roztokem	39
3.4.2	Extrakce vodou	40
3.4.3	Postup.....	40
3.5	Metodika stanovení rutinu.....	40
3.5.1	Stanovení rutinu v sušeném a čerstvém materiálu.....	40
3.5.2	Metodika stanovení rutinu v kapalných vzorcích	41
3.5.3	Identifikace rutinu metodou HPLC.....	41

3.6	Metodika senzorického hodnocení.....	43
3.6.1	Postup provedení.....	44
3.7	Použité programy	44
4	Výsledky a diskuze	45
4.1	Obsah rutinu v sušeném a čerstvém materiálu.....	45
4.2	Obsah rutinu v sirupech	45
4.3	Výsledky senzorické analýzy.....	47
5	Závěr	51
6	Seznam informačních zdrojů	53
7	Přílohy.....	56

Seznam použitých zkratk

WHO – Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

ROS – Reaktivní formy kyslíku (Reactive Oxygen Species)

RNS – Reaktivní formy dusíku (Reactive Nitrogen Species)

LDL – lipoproteiny s nízkou hustotou (Low-Density Lipoproteins)

TPA – tkáňový polypeptidický antigen (Tissue Polypeptide Antigen)

HIV – virus lidské imunitní nedostatečnosti (Human Immunodeficiency Virus)

AIDS – Syndrom získaného selhání imunity (Acquired ImmunoDeficiency Syndrome)

H1N1 virus – virus mexické/prasečí chřipky

SÚKL – Státní ústav pro kontrolu léčiv

HPLC – Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High-Performance Liquid Chromatography)

SPE – Extrakce pevným sorbentem (Solid-Phase Extraction)

LOQ – Mez stanovitelnosti (Limit of Quantification)

Úvod

Bez černý (*Sambucus nigra* L.) je bohatým zdrojem flavonoidů. Flavonoidy jsou rozsáhlou skupinou rostlinných fenolů. Nacházejí se v potravě rostlinného původu, v zelenině, ovoci, vláknině, čaji, víně, chmelu a léčivých rostlinách. ^(11, 18)

V posledních letech roste zájem o studium těchto přírodních látek, neboť mají příznivé účinky na lidský organismus. Flavonoidy jsou známé především pro své antioxidační vlastnosti. Brání krevní lipoproteiny o nízké hustotě (LDL) před oxidační modifikací, která může být příčinou rozvoje aterosklerózy. Rovněž mají chemopreventivní úlohu v organismu. Mají schopnost blokovat iniciaci nádorového procesu, zastavit buněčný cyklus a indukovat buněčnou smrt přednostně v rakovinových buňkách. Vykazují i řadu jiných biologických účinků jako např. antialergické, antibakteriální, antivirové a protizánětlivé působení, čímž zabraňují vzniku chronického zánětu. ^(5, 10, 11, 12, 15)

Jedním z nejvíce studovaných flavonoidů je rutin (kvercetin 3-rutinosid). Stejně jako ostatní flavonoidy působí blahodárně na zdraví člověka. Díky antioxidačním vlastnostem pozitivně působí proti hypertenzi a ateroskleróze. Zvyšuje elasticitu cév a zároveň snižuje jejich fragilitu. Posiluje imunitní systém. Reguluje srážení krve a hladinu cholesterolu v krvi. ⁽¹²⁾

Cílem předkládané bakalářské práce je podat přehled informací o vlivu a působení flavonoidů na lidský organismus. Dalším cílem je seznámení se s metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), která se pro stanovení fenolických látek používá ve velké míře. Mezi její výhody patří široká oblast použitelnosti a schopnost analyzovat vzorky i ve velmi nízké koncentraci. ^(7, 8, 12) Prostřednictvím této metody stanovit obsah rutinu v rostlinných vzorcích při různém zpracování květů bezu černého. V rámci práce byly navrženy různé způsoby přípravy sirupu z květů bezu černého a sirupy byly připraveny. Dalším cílem bylo ohodnotit chuť jednotlivých bezových sirupů. K tomuto účelu posloužil sensorický preferenční test. A na závěr bylo

vybráno nejvhodnější zpracování bezového vzorku jak z hlediska sensorického, tak i obsahu rutinu.

1 Teoretická část

1.1 Rostlinné fenolické látky

Fenoly jsou rozsáhlou a různorodou skupinou sekundárních metabolitů. V některých rostlinách se nacházejí ve vysokých koncentracích. Jsou složeny z jednoho nebo více aromatických nebo heterocyklických jader, které jsou kondenzované nebo spojené alifatickým řetězcem. Mají jednu nebo více hydroxylových (nebo methoxylových) skupin (polyfenoly). Mají redukční, oxidační a chelatační vlastnosti. Doposud bylo izolováno přes 5000 přírodních látek s chemopreventivním účinkem, jednalo se převážně o látky fenolické a polyfenolické povahy. ^(4, 9, 20, 26)

1.1.1 Skupiny rostlinných fenolů

- fenolové kyseliny a jejich deriváty
- třísloviny
- deriváty kumarinu
- flavonoidy
- isoflavonoidy
- prenylované flavonoidy
- deriváty stilbenu
- ostatní fenolové látky ⁽⁴⁾

1.1.2 Nejběžnější rostlinné fenoly

Nejběžnějšími rostlinnými polyfenoly jsou flavonoidy a fenolové kyseliny, které považujeme za důležité biologické aktivní látky. Na celkovém příjmu polyfenolů se flavonoidy podílí přibližně ze dvou třetin, fenolové kyseliny asi jednou třetinou a ostatní polyfenoly tvoří minoritní část. ^(5, 22)

1.1.3 Fenolové kyseliny

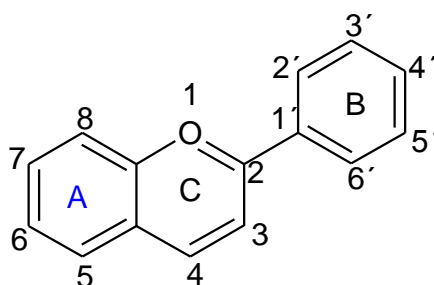
Nejčastěji se vyskytují ve formě esterů. V této formě se váží karboxylem na hydroxylové skupiny sacharidů. Nejběžnější a nejznámější fenolovou kyselinou je

kyselina chlorogenová, která se hojně vyskytuje v kávě. V jednom šálku kávy je přibližně 50-150 mg této kyseliny. Může se stát, že velcí konzumenti kávy mohou přijímat více fenolových kyselin než flavonoidů. Vyskytuje se také v bramborách a v dalších druzích zeleniny a ovoce. Další zástupci fenolových kyselin jsou kyselina ferulová, jež je součástí vlákniny, kyselina gallová a v neposlední řadě kyselina kávová.⁽⁵⁾

1.1.4 Flavonoidy

Flavonoidy jsou rozsáhlou skupinou rostlinných polyfenolů. Jsou izolovány z cévnatých rostlin. V molekule obsahují dva benzenové kruhy, které jsou spojené tříuhlíkovým řetězcem. Tato struktura se označuje jako uspořádání C₆-C₃-C₆. Vyskytují se v potravě rostlinného původu. Živočichové nejsou schopni syntetizovat aromatické sloučeniny s benzenovým kruhem. Z tohoto důvodu musí tyto organické antioxidanty přijímat v potravě.^(6,9,11)

V rostlinách se z velké části flavonoidy vyskytují jako β-glykosidy a sacharidovou složku tvoří nejčastěji glukóza, rhamnóza, galaktóza anebo kyselina glukuronová. Jednotlivé flavonoidy se od sebe liší chemickou strukturou a vlastnostmi. Základní struktura flavonoidních látek je znázorněna na obr 1.^(5, 6)



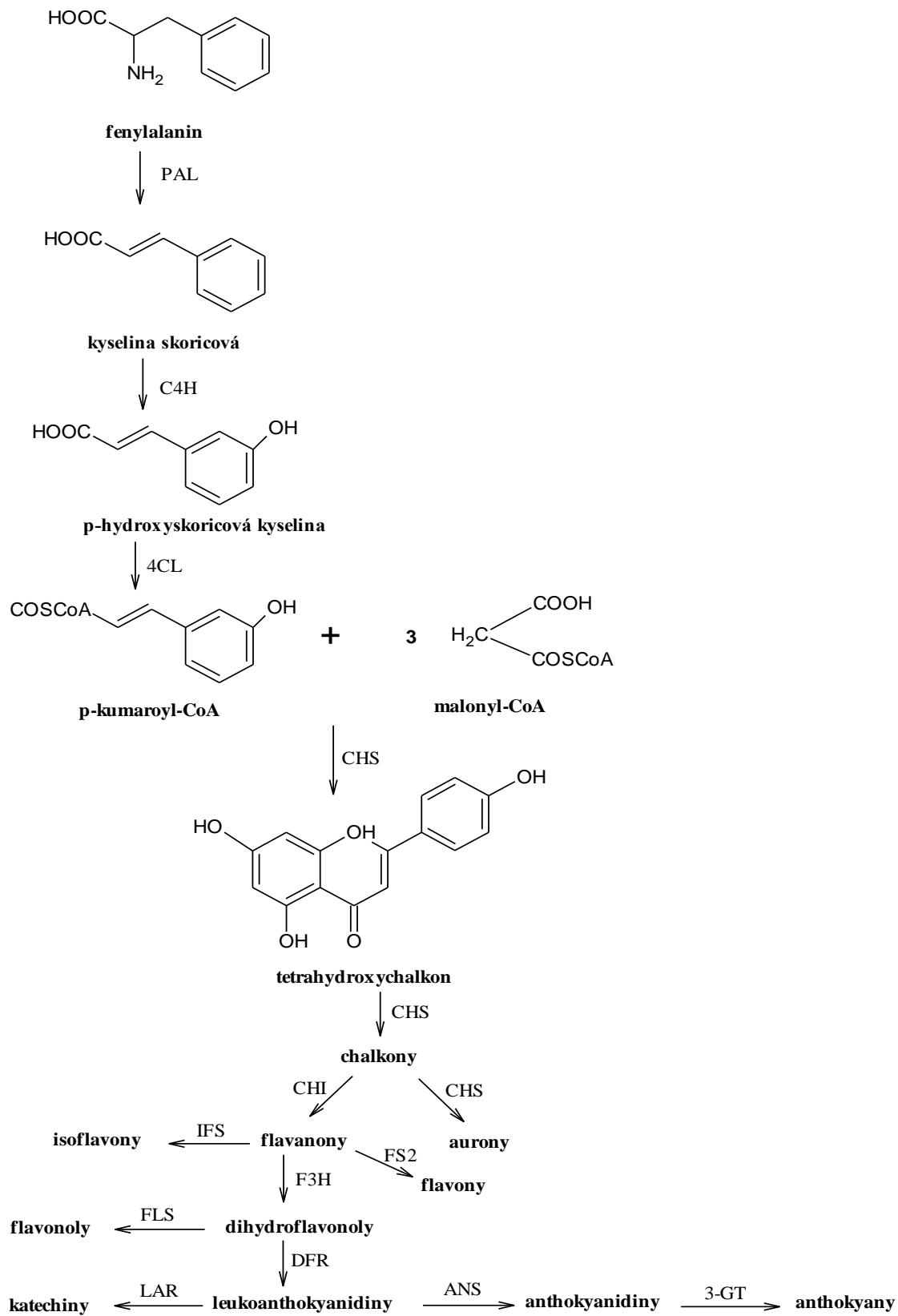
Obr.1 Základní struktura flavonoidů:

Flavanový skelet je složen ze dvou benzenových kruhů (A a B) a kruhu, který je odvozen od 2H-pyranu (C). V poloze C-2 je kruh B spojen s kruhem C.⁽⁶⁾

1.1.4.1 Biosyntéza flavonoidů

Flavonoidy jsou syntetizovány z aromatických aminokyselin fenylalaninu a tyrozinu, které jsou transformovány na kyselinu skořicovou a parahydroxyskořicovou.

Důležitým krokem je vznik p-kumaroyl-CoA, jenž je odvozený od L-fenylalaninu. P-kumaroyl-CoA vstupuje do kondenzační reakce se třemi molekulami malonyl-CoA. Touto reakcí vzniká klíčový meziprodukt - tetrahydroxychalkon. Jednotlivé podskupiny flavonoidů vznikají sérií metabolických přeměn z této základní sloučeniny. ^(16, 28)



Obr. 2 Biosyntéza flavonoidů

PAL – fenylalaninamonium lyasa, C4H – cinnamat-4-hydroxylasa, 4CL – 4-kumaroyl-CoA ligasa, CHS – chalkon synthasa, CHI – chalkon isomerasa, IFS – isoflavon synthasa, FS2 – flavon synthasa 2, F3H – flavanon-3-hydroxylasa, FLS – flavonol synthasa, DFR – dyhydroflavonol reduktasa, LAR – leukoanthokyanidin reduktasa, ANS – anthokyanidin synthasa, 3-GT – flavonoid-3-glukosyltransferasa. ^(28, 29)

1.1.4.2 Klasifikace flavonoidů

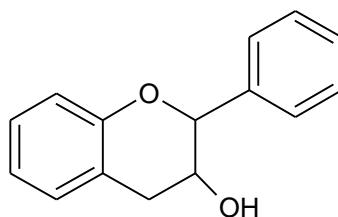
Podle stupně oxidace C3 řetězce rozlišujeme 11 strukturních tříd flavonoidů:

- katechiny
- leukoanthokyanidiny
- anthokyaniny
- flavanony
- flavanonoly
- flavony
- flavonoly
- chalkony
- dihydrochalkony
- aurony
- isoflavony

(6)

1.1.4.2.1 Katechiny

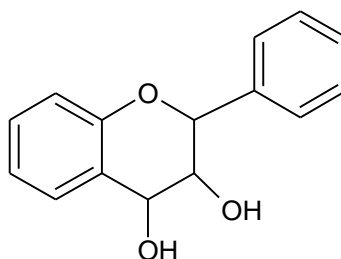
Přijímáme je především v čaji, ovoci a čokoládě. Jsou to bezbarvé sloučeniny, ale v reakcích enzymového hnědnutí se z nich tvoří hnědé pigmenty. ^(5, 6)



Obr.3 Obecná struktura katechinů

1.1.4.2.2 Leukoanthokyanidiny

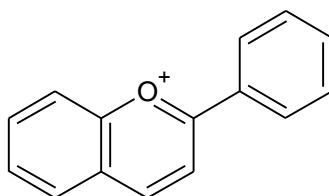
Opět jde o bezbarvé sloučeniny, jejichž hnědé pigmenty vznikají v procesu enzymového hnědnutí. Při zpracovávání ovoce a zeleniny v kyselém prostředí můžeme z bezbarvých leukoanthokyanidinů získat příslušné barevné anthokyanidiny. ⁽⁶⁾



Obr. 4 Obecná struktura leukoanthokyanidinů

1.1.4.2.3 Anthokyanany (anthokyaniny)

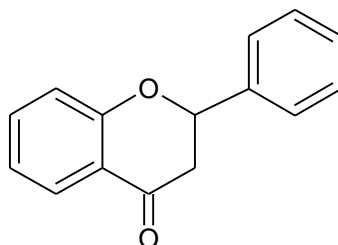
Anthokyanany jsou glykosidy anthokyanidinů. Jedná se o nejrozšířenější rostlinná barviva, která jsou rozpustná ve vodě. Existuje asi 300 druhů anthokyanů., Červená, fialová a modrá barva ovoce, zeleniny i květin je dána právě těmito flavonoidy. Hlavními zdroji anthokyanů jsou hrozny vinné révy, švestky, maliny, jahody, ostružiny, jablka, hrušky, borůvky, brusinky, lilek, černý a červený rybíz a červené zelí. Denní příjem je individuální, ale může dosahovat až 200 mg. ^(4, 5, 6)



Obr. 5 Obecná struktura anthokyanů

1.1.4.2.4 Flavanony

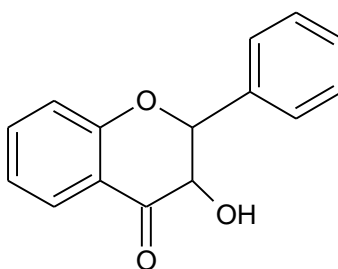
Vyskutují se v citrusovém ovoci. Jsou bezbarvé až světle žluté. V denním příjmu tvoří několik desítek miligramů. ^(5, 6)



Obr. 6 Obecná struktura flavanonů

1.1.4.2.5 Flavanonoly

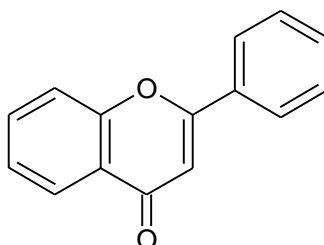
V rostlinách se nenacházejí ve vyšších koncentracích, proto nejsou tolik významné. ⁽⁶⁾



Obr. 7 Obecná struktura flavanonolů

1.1.4.2.6 Flavony

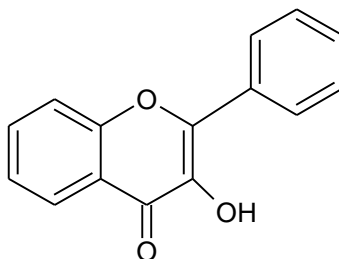
Spolu s flavonoly to jsou nejrozšířenější žluté pigmenty rostlin. Apigenin a luteolin jsou flavony, se kterými se setkáme nejčastěji. Flavony můžeme izolovat z některých druhů mandarinek, máty, fiků, z listů jinanu dvoulaločného (*Ginkgo biloba*) a jiných rostlin. ⁽⁶⁾



Obr. 8 Obecná struktura flavonů

1.1.4.2.7 Flavonoly

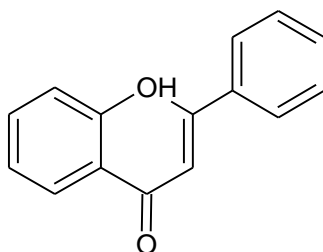
Opět se jedná o žlutá barviva. Známymi zastupci flavonolů jsou kemferol, kvercetin a myricetin. Kemferol je např. využíván v tradiční medicíně pro prevenci a léčbu chorob. Nacházíme je hlavně v ovoci a zelenině (především v cibuli), ale i v nápojích jako je čaj. Kvercetin a jeho deriváty jako např. rutin patří k nejvíce studovaným flavonoidům. ^(5, 6, 21)



Obr. 9 Obecná struktura flavonolů

1.1.4.2.8 Chalkony

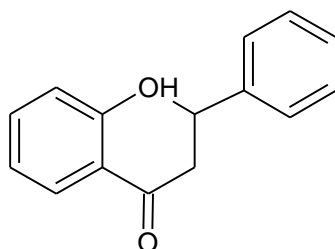
V potravinářsky významných rostlinách se vyskytují v minimálních koncentracích. Mají význam jako barviva květů pro velké množství rostlin. ⁽⁶⁾



Obr. 10 Obecná struktura chalkonů

1.1.4.2.9 Dihydrochalkony

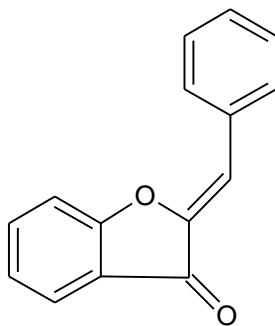
Ani chalkony se nenechávají ve velkém množství v potravinářsky významných materiálech. Nejznámějším zástupcem je floretin a jeho glykosidy, které způsobují hořkou chuť. Vyskytují se u jabloní. ⁽⁶⁾



Obr. 11 Obecná struktura dihydrochalkonů

1.1.4.2.10 Aurony

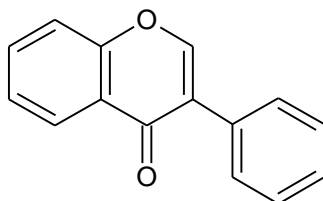
Aurony patří mezi nejvýznamnější pigmenty květů. Nachází se v sójových bobech, ale jinak se v potravinách příliš nevyskytují. ⁽⁶⁾



Obr. 12 Obecná struktura auronů

1.1.4.2.11 Isoflavony

Ve vyšších koncentracích byly prokázány pouze v rostlinách čeledi bobovitých (Fabaceae). Jsou součástí sóji a řadíme je mezi fytoestrogeny. Příjem je přibližně 30-40 mg/den. ^(5, 6)



Obr. 13 Obecná struktura isoflavonů

1.1.5 Příjem polyfenolů z potravy

Hlavními zdroji těchto látek jsou zelenina, ovoce, vláknina, čaj, víno, chmel, aromatické a léčivé rostliny a další. Mezi druhy rozdílů v obsahu těchto látek jsou dosti výrazné. Přesto není vhodné preferovat jeden druh potravy s vysokým obsahem fenolických látek. Vhodnější je pravidelná konzumace různého sortimentu rostlinné stravy. Podle doporučení WHO by průměrný denní příjem měl obsahovat 3 porce zeleniny (cca 250 g) a 2 porce ovoce (cca 150 g).^(18, 20)

1.1.6 Fenolické látky a jejich význam

V současnosti roste zájem o studium těchto přírodních látek, neboť je dán do souvislosti jejich příjem v potravě se snížením výskytu některých nemocí jako např. rakovina a kardiovaskulární choroby. V mnohé literatuře si můžeme přečíst o tzv. „francouzského paradoxu“ tedy o nízké mortalitě na kardiovaskulární onemocnění ve Francii vzhledem k relativně vysokému obsahu tuků ve stravě. Jedním z pravděpodobných vysvětlení je zvýšený příjem červeného vína, které je bohaté na polyfenoly.⁽⁵⁾

V biologických testech s tkáňovými kulturami, nebo v pokusech na zvířatech a s lidskými dobrovolníky se prokazují jejich synergické účinky jako např. antioxidační aktivita, která převyšuje antioxidační kapacitu vitamínu C a E.⁽²⁰⁾

V některých klinických studiích je naznačeno, že příjem potravin obsahujících určité polyfenoly může chránit organismus před některými formami rakoviny. Jedná se především o rakovinu plic, trávicího traktu, prsu a prostaty. Byla provedena řada experimentů na zvířatech a nádorových buňkách a byly prokázány antikarcinogenní účinky. Fenolické látky působí jako blokátory iniciace nádorového procesu, supresory buněčné proliferace a progresu nádorů a jako inhibitory endogenní tvorby karcinogenů. Proto můžeme polyfenoly považovat za chemopreventivní prostředky. Tyto studie však nejsou tolik zřejmé, a proto nejsou akceptovány širokou odbornou veřejností.^(5, 20, 26)

Předpokládá se, že za protektivní účinky rostlinných fenolů jsou zodpovědné jejich schopnosti zhaset reaktivní kyslíkové radikály a omezovat jejich tvorbu chelatací iontů přechodných kovů, především kationtů železa. Chrání krevní lipoproteiny o nízké

hustotě (LDL) před oxidační modifikací. Tato oxidační modifikace je příčinou rozvoje aterosklerózy. ⁽⁵⁾

Působí proti vzniku krevních sraženin a tím předchází infarktu myokardu nebo mozkové mrtvici. Mají i řadu jiných účinků působících na úrovni přenosu signálů a tím se uplatňují se při kontrole buněčného cyklu popřípadně při apoptóze. ⁽⁵⁾

1.1.7 Vstřebávání a metabolismus fenolických látek

Hlavním místem pro vstřebávání fenolických látek v trávicím traktu je tenké a tlusté střevo. Ovšem některé fenolické látky přijímané v nápojích jsou částečně resorbovány již v dutině ústní. ⁽⁵⁾

V tenkém střevě je malá část glykosidů fenolických látek hydrolyzována, aglykony a ostatní nedotčené glykosidy se zde vstřebávají aktivním i pasivním transportem. ⁽²⁰⁾

Deglykolizace těchto látek se dokončuje v tlustém střevě. Složitější aglykony, jako například flavonoidy se zde štěpí na menší fragmenty. Část vzniklých metabolitů se vyloučí z těla stolicí a část se zpětně vstřebává do enterohepatálního oběhu. ⁽²⁰⁾

Pouze malý podíl fenolů je v játrech biotransformován a vylučuje se žlučí do stolice nebo ledvinami. ⁽²⁰⁾

Po resorpci v trávicím traktu jsou fenolické látky dále metabolizovány. Přeměny jsou uskutečňovány prostřednictvím enzymů přítomných ve tkáních a jsou velice podobné metabolismu léčiv či jiných xenobiotik. ⁽⁵⁾

1.1.8 Biologické účinky flavonoidů

Flavonoidy vykazují řadu biologických účinků, které zahrnují antialergické, antimikrobiální, antivirové, protizánětlivé a vazodilatační vlastnosti. Největší pozornost je však věnována antioxidační aktivitě. ⁽¹⁰⁾

1.1.8.1 Antioxidační působení (vychytávání volných radikálů)

Jednou z možností, jak chránit organismus před volnými radikály, je působení antioxidantů. Antioxidanty jsou molekuly, jež mohou omezovat anebo dokonce zabraňovat oxidační destrukci látek. Tento účinek flavonoidů je založen na vychytávání reaktivních forem kyslíku (ROS) a reaktivních forem dusíku (RNS), také na vytváření

chelátů s ionty přechodných kovů a na inhibici enzymových systémů, které vytváří volné radikály. ^(16, 18)

Zvýšení reaktivních forem kyslíku v organismu způsobuje oxidační stres, který následně vede k poškozením mnohých biomakromolekul jako jsou proteiny, DNA a lipidy. ⁽¹⁶⁾

Peroxidace lipidů představuje řetězovou reakci, při které vznikají hyperoxidy, které stimulují vaskulární buňky k tvorbě chemotaktických monocytů a faktorů podmiňujících vznik makrofágů, které následně vedou ke vzniku pěnových buněk a aterosklerotických plaků. Peroxidace lipidů rovněž způsobuje oxidaci lipoproteinů s nízkou hustotou (LDL), což má vliv na rozšiřování trombů, protože v endotelových buňkách a monocytech je stimulována prokoagulační aktivita, a také brání rozšiřování cév, neboť je snížena exprese endoteliální NO syntázy. ⁽¹⁶⁾

1.1.8.2 Antimutagenní účinek

Chemopreventivní působení flavonidů je dáno souhrou tří mechanismů: (1) prevence karcinogenní aktivity, (2) prevence proliferace nádorových buněk pomocí inaktivačních nebo regulačních enzymů a signálů a (3) indukci buněčné smrti (apoptózy). ⁽²⁷⁾

Flavonoidy umí ovlivňovat děje, které hrají svou úlohu při vzniku rakoviny. Ve většině případů se prokázalo, že mají inhibiční účinek na enzymy přítomné při vzniku rakoviny. Příklady těchto enzymů jsou proteintyrosin kináza, TPA-dependentní ornitin dekarboxyláza a DNA-topoizomeráza. ⁽¹⁶⁾

1.1.8.3 Antimikrobiální účinek

Již na počátku 80. let bylo zjištěno, že některé rostliny syntetizují flavonoidy jako odpověď na bakteriální infekci. Např. v jedné německé studii zkoumali jaký vliv mají fytochemické sloučeniny přítomné v koncentrátech z černého rybízu a černého bezu na růst mikroorganismů. Koncentrát z černého rybízu inhiboval růst grampozitivní bakterie *Staphylococcus aureus* a koncentrát z černého bezu inhiboval růst grampozitivní bakterie *Enterococcus faecium*. ^(16, 25)

1.1.8.4 Antivirový účinek

Flavonoidy mají též antivirový účinek. Významnými léky pro léčbu AIDS jsou inhibitory HIV reverzní transkriptázy. Je známo, že čím větší je počet navázaných hydroxylových skupin tím nižší jsou antivirové účinky. ⁽¹⁶⁾

Antivirový účinek byl rovněž prokázán na *in vitro* pokusu s bezinkovým extraktem. Identifikované flavonoidy se přímo navázaly na lidský Influezavirus A (H1N1). Tato přímá vazba způsobila neschopnost H1N1 viru vstoupit do hostitelské buňky a tím zastavit virovou infekci. ⁽²⁴⁾

1.1.9 Kvercetin

Jak již bylo řečeno kvercetin je nejčastější flavonoid, který zařazujeme do podskupiny flavonolů. Nachází v široké škále ovoce, zeleniny a nápojích. ⁽¹⁵⁾ V přírodních materiálech se nicméně vyskytuje hlavně vázaný ve formě glykosidů.

1.1.9.1 Kvercetin a toxicita

Není karcinogenní, ovšem při užívání vysokých dávek byly odhaleny nepříznivé účinky pro lidský organismus. Vysokých dávkou jakou je například 2 g/kg váhy/den může způsobit chronickou nefropatii. Nižší dávky 50-500 mg/kg/den nemají výrazné vedlejší účinky na lidské zdraví. U dávek vyšších než 50 mg/kg/den byla prokázána renální toxicita, ale bez známek nefropatie. A tak tedy doporučená dávka kvercetinu činí 35-36 mg/kg/den. ⁽¹⁵⁾

1.1.9.2 Kvercetin a kardiovaskulární onemocnění

Srdeční choroby jsou v dnešní době nejčastější onemocnění. Hlavní rizikové faktory těchto civilizačních onemocnění jsou kouření, alkohol, obezita, hypertenze, nesprávné nutriční návyky, nízká fyzická aktivita aj. ⁽¹⁶⁾

Jeho preventivní role je spojována s jeho protizánětlivými a antioxidačními schopnostmi. Nižší výskyt kardiovaskulárních onemocnění spojený s 50 krát vyšším příjmem kvercetinu byl prokázán pomocí epidemiologických studií. Kardioprotektivní účinek kvercetinu je zprostředkován inhibicí oxidace lipoproteinů s nízkou hustotou (LDL), čímž chrání LDL před oxidačním poškozením. Dále snižuje schopnost krevních destiček vytvářet krevní sraženiny a rovněž zvyšuje koronární krevní průtok. ^(15, 16)

1.1.9.3 Rutin

Rutin (kvercetin 3-rutinosid) je nejznámější derivát kvercetinu. Má pozitivní účinky na elasticitu cév a snižuje jejich fragilitu. Proto se využívá při poruchách cév. Díky antioxidační schopnosti zamezuje vniknutí hypertenze a aterosklerózy. Také posiluje imunitní systém. Reguluje sražení krve a hladinu cholesterolu v krvi. ⁽¹²⁾

1.2 Bez černý (*Sambucus nigra* L.)

1.2.1 Obecné znaky

Je to listnatý 2-7 m vysoký keř nebo strom se šedohnědou borkou a bílou porézní dřevinou. Patří do čeledi zimolezovitých (*Caprifoliaceae*). Jeho listy jsou 2-3 jařmé, vstřícně postavené, lichozpeřené, na bázi jsou celokrajné, pak nestejně pilovité. Květenství tvoří bohaté, ploché a pětihranné chocholíky. Květy jsou malé, bělavé, pětičetné a víceméně pravidelné. Mají velmi intenzivní vůni. Květenství je též známé jako tzv. kosmatice. Plodenství je převislé s červenofialovými stopkami a s kulovitými plody. Plody jsou peckovice se třemi semínky, červenofialové až tmavé, známé jako bezinky. Mají měkkou a inkoustově barvící dužinu. ^(1, 2)

Bez černý patří od nepaměti k vysoce ceněným léčivkám. Drogou jsou především květy (*Flos sambuci*), sbírají se v květnu až červnu, nejlépe kolem poledne. Plody (*Fructus sambuci*) jsou sbírány v září a říjnu. Někdy se sbírají i list a mladá kůra. Listy na jaře a kůra se sbírají po celý rok. Od sběru kořene se upustilo. Zřídka se používá k přímé konzumaci, spíše se zpracovává na potravinové doplňky a extrakty slouží k výrobě nápojů. ^(1, 3)

1.2.2 Výskyt

Černý bez je velmi rozšířený druh rostliny. Roste na slunných místech ve většině částí Evropy, Asie, severní Afriky a ve Spojených státech amerických. ⁽³⁾

1.2.3 Obsažené látky

Všechny odrůdy černého bezu obsahují v plodech vysoké množství anthokyanů a organických kyselin. Květy jsou výborným zdrojem flavonoidů a fenolových kyselin, neboť obsahují tyto látky ve vysokých koncentracích. ^(3, 22)

V plodech bezu se nachází také cukry. Nejhojněji zastoupeny jsou fruktóza a glukóza. Naopak sacharóza se vyskutekuje pouze v malém množství. Z organických kyselin obsahuje především kyselinu citrónovou, jablečnou, fumarovou a shikimovou. Mezi nejčastější anthokyany patří kyanidin 3-sambubiosid-5-glukosid, kyanidin 3,5-diglukosid, kyanidin 3-sambubiosid, kyanidin 3-glukosid a kyanidin 3-rutinosid. Skupina kvercetinů zahrnuje kvercetin, kvercetin 3-rutinosid, kvercetin 3-glukosid a hlavně kvercetin 3-rutinosid neboli rutin. ⁽³⁾

1.2.4 Použití v léčitelství

První zmínky o užívání květů bezu černého pro medicínské účely v Evropě pochází ze středověku. Podle středověkých herbářů se užívaly při nachlazení a proti otokům. Květy i plody této léčivé rostliny jsou na seznamu oficiálních léčivých přípravků SÚKL (Státní ústav pro kontrolu léčiv). ⁽²³⁾

Květ má potopudné, ale i močopudné účinky. Také příznivě ovlivňuje cévní stěny – pomáhá při nemocech cév. Podává se při nachlazení, zejména horních cest dýchacích – rozpouští hleny, klidí zanícenou sliznici a tím podporuje vykašlávání. Kromě toho má i protikřečový účinek při nemocech močového měchýře a střev. Pozitivně ovlivňuje tvorbu mateřského mléka a kontaktní ekzémy. Plody působí jako účinné analgetikum při bolestech. Je prokázán i protizánětlivý efekt. Navíc mají mírné projímavé účinky a mírně snižují krevní tlak. O listech je známo, že čistí krev a pokožku. Pomáhají proti akné a proti nepříjemnému tělesnému pachu. ^(1, 2)



Obr. 14 Černý bez

1.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

HPLC se vyvinula v 70. letech z plynové chromatografie. Používá se pro separaci komplikovaných směsí látek. Její vysoké účinnosti se dosahuje použitím stacionárních fází, které obsahují malé a pravidelné částice jednotného tvaru a velikosti, které homogenně vyplňují kolonu. Mobilní fáze je kapalná a průtok této mobilní fáze je zajištěn vysokým tlakem (až desítky MPa). Dávkuje se malá množství vzorku (řádově mikrolitry). K detekci jsou nezbytné citlivé detektory umožňující kontinuální monitorování složek na výstupu z kolony. Signál detektoru zpracovává počítač. Z výše uvedených informací je zřejmé, že HPLC vyžaduje poměrně náročnou instrumentaci. ⁽⁸⁾

Velkou výhodou HPLC je široká oblast použitelnosti. Lze analyzovat ionty, polární i nepolární látky, málo těkavé, tepelně nestabilní i vysokomolekulární složky. Mezi další výhody patří, že složením mobilní fáze můžeme ovlivňovat separaci. Nevýhodou je, že vyžaduje náročnou instrumentaci a komplikací je i složitý mechanismus separace. (8)

1.3.1 Principy separace látek v kapalinové chromatografii

Pro separace se využívá adsorpce, rozdělování mezi dvě fáze na základě různé rozpustnosti, iontová výměna, biospecifická interakce (molekulové rozpoznávání) a síťový efekt. (8)

Pokud použijeme polární stacionární fázi, jsou kolonou nejméně zadržovány nepolární komponenty vzorku a naopak, při použití nepolární stacionární fáze jsou nejméně zadržovány polární látky. (19)

Při nástřiku vzorku do kolony se utváří zóna, která obsahuje všechny látky ze vzorku. Poté jsou tyto látky unášeny mobilní fází a následně na koleně, která je naplněná sorbentem dochází k jejich separaci. Po výstupu první látky z kolony detektor detekuje její přítomnost v eluátu a zaznamená eluční pík. Takto to probíhá i při výstupu ostatních látek z kolony a na gramatografu obdržíme několik oddělených elučních píků. (7)

1.3.2 Kvalitativní analýza

Klíčovým bodem je znalost retenčních dat chromatografovaných látek. Identifikace se provádí porovnáním retenčního času stanovované látky a standardu, který byl separován za stejných podmínek. Jeden z nejlepších způsobů identifikace je pomocí hmotnostního spektrometru. (7)

1.3.3 Kvantitativní analýza

Základem pro kvantitativního vyhodnocení je plocha pod eluční křivkou. Nejčastěji se pro kvantitativní stanovení používá součin výšky píku s šířkou píku v polovině výšky píku. Většinou však chromatografy bývají vybaveny integrátorem plochy píků. (7)

1.3.4 Přístroje pro HPLC

Mobilní fáze je během isokratické eluce vedena ze zásobníku přes odplyňovač do vysokotlakého čerpadla. Při gradientové eluci se komponenty mobilní fáze ze zásobníku přivádějí do směšovače, kde se programově v zvoleném poměru mísí a následně postupují do čerpadla. Z čerpadla je mobilní fáze vedena přes tlumič pulzů čerpadla do kolony. Bezprostředně za kolonou je připojen detektor. Vyhodnocení naměřených dat zajišťuje příslušné obslužné software. ⁽⁷⁾

1.3.4.1 Čerpadla pro HPLC

Čerpadla zajišťují průtok mobilní fáze. Musí být vyrobeny z materiálů odolných vůči korozi. Nejvíce se pracuje s tlaky od 1 do 60 MPa, při průtocích mobilní fáze od 0,1 do 10 ml.min⁻¹. Proto je dávana přednost kontinuálně pracujícím pulzujícím čerpadlům pístovým anebo membránovým. Při každém pohybu pístu nebo membrány vpřed dochází k vytlačení malého objemu mobilní fáze. Pulzace je tlumena buď pomocí dalšího čerpadla pracujícího v opačné fázi anebo pomocí tlumiče pulzů. Moderní čerpadla jsou doplněna elektronicky řízenými zpětnovazebnými systémy, reziduální tlakové pulzace přímo ovládají otáčky motoru. ^(7, 17, 19)

1.3.4.2 Dávkování vzorků

Ustupujícím způsobem je nástřik mikrostříkačkou pomocí tzv. „stop flow“ ventilu. Tento ventil umožní krátkodobé rozpojení systému čerpadlo – kolona a po nástřiku dojde opět ke spojení těchto částí. Převažujícím způsobem nástřiku vzorku je použitím šesticestného kohoutu s dávkovací smyčkou. Smyčka o známém a konstantním objemu se naplní vzorkem, potom se kohout přepne do druhé polohy a eluent protéká smyčkou a vnese vzorek do kolony. ⁽⁷⁾

Je třeba dbát na to, aby vzorky byly při dávkování dokonale rozpuštěny nejlépe v rozpouštědle o stejném složení jako má mobilní fáze. Popř.pokud se ve vzorku nacházejí tuhé částičky, tak je odfiltrovat. ⁽¹⁷⁾

1.3.4.3 Kolony pro HPLC

Volba vhodné kolony má rozhodující význam, neboť výsledek analýzy je určován především kvalitou kolony a její náplní. Separační kolony musí odolat vysokému tlaku

mobilní fáze. Používají se rovné kolony o délce 10–100 cm, nejčastěji 10-20cm o vnitřním průměru 0,2-2 cm. Obvykle bývají vyrobeny z nerez oceli nebo speciálního skla. ^(7, 17, 19)

Přírodní vzorky, které obsahují mnoho balastních látek, mohou předčasně znehodnotit kolony. Proto se často před vlastní kolonu zařazuje ochranná předkolona, která je levnější a chrání separační kolonu. ⁽⁷⁾

Kolony pro HPLC jsou plněny profesionálně. Velikost zrn sorbentu se pohybuje mezi 3-50 μm , nejčastěji mezi 5-10 μm . ⁽⁷⁾

1.3.4.4 Náplně a eluenty

- **Silikagel** je polární adsorbent. Má slabě kyselé vlastnosti a silně zadržuje bazické látky. Obvykle bývá amorfni struktury, snadno přijímá vodu. Jeho běžná aktivace je při 180 °C.
- **Alumina** je krystalická forma Al_2O_3 . Povrch zrn je bazický. Používá se k oddělení slabě kyselých složek vzorku. Aktivuje se zahřátím na 400 °C po dobu 6-16 hodin.
- **Florisil** (křemičitan hořečnatý) je slabě kyselý polární adsorbent. ⁽⁷⁾

Povrch adsorbentu je obsazován molekulami eluentu. Poté co je vzorek vnesen do kolony, musí molekula složky vytěsnit z povrchu adsorbentu odpovídající počet molekul eluentu. Velký vliv na tento stav má adsorbční energie eluentu, která je dána velikostí interakce mezi eluentem a povrchem adsorbentu. Velikost interakce mezi eluentem a povrchem adsorbentu se nazývá eluční síla. Interakce mezi složkou a eluentem nejsou tak významné. ⁽⁷⁾

Z běžných rozpouštědel má nejvyšší eluční sílu voda a nejmenší pentan. Čím větší je eluční síla rozpouštědla, tím pevněji je eluent adsorbován a tedy složka je adsorbovaná méně. ⁽⁷⁾

1.3.4.5 Detektory

Nejčastějšími typy detektorů jsou pŕtokový fotometrický a fluorimetrický detektor. Eluát protěka tzv. měrnou celou malého objemu s velkou optickou délkou, často 5-10 μl při šířce 10 mm. Absorbance analyzovaných látek je zaznamenávána při jejich absorbčních maximech Moderní detektory umožňují proměnlivě a programově měnit

vlnovou délkou. Tzv. diode array detektor je schopný proměřit ve zvoleném okamžiku celé UV/VIS spektrum dané složky. Získává kvalitativní údaje o sledované složce. Méně běžný je refraktometrický detektor. Ten registruje změny indexu lomu eluátu a používá se pro látky, které nemají potřebnou absorpci. ^(7.19)

1.4 Senzorická analýza

Senzorická analýza je vědecký obor, který se rozvíjel v průběhu druhé poloviny 20. století. Jedná se o hodnocení založené bezprostředně na našich smyslech. Výsledky analýzy jsou zpracovávány lidským centrálním nervovým systémem. Musí probíhat za takových podmínek, aby bylo zajištěno objektivní, přesné a reprodukovatelné měření. ^(14, 30)

1.4.1 Smyslové vnímání

Při sensorické analýze potravin vnější popud vyvolá podráždění receptoru a vzniká vzruch. Vzruchem zpravidla bývá tok iontů. Vzruch vycházející z receptoru se nazývá vnitřní podnět. Vnitřní podnět je veden pomocí dostředivého (centripetálního) nervu od receptoru do centrální nervové soustavy. V centrální nervové soustavě přichází tento vzruch nejdříve do primárních sensorických oblastí. Informace se dále zpracovávají v asociačních oblastech. ⁽³⁰⁾

1.4.2 Párová porovnávací zkouška

Metoda spočívá v porovnání dvou vzorků a stanovení rozdílu mezi nimi podle preference jednoho z nich. V případě preferenční zkoušky se ptáme, kterému vzorku z této dvojice dáváte přednost. Pokud se navíc jedná o oboustraný test, tak zjišťujeme zda existuje rozdíl v preferenci. ⁽¹³⁾

Pro interpretaci výsledků je třeba si připravit dotazník (test). Otázky které jsou v něm kladeny nesmí ovlivňovat odpovědi posuzovatele. ⁽¹³⁾

2 Cíle práce a předpokládané hypotézy

Hlavním cílem této práce bylo podat dostupné informace o účincích flavonoidů na lidský organismus.

Dalšími cíli je:

- Navrhnout různé postupy přípravy sirupů z květů černého bezu a tyto sirupy připravit.
- Seznámení se s metodou vysokoúčinné plynové chromatografie a prostřednictvím této metody stanovit obsah rutinu v čerstvých a sušených květech černého bezu, v sirupech z obchodní sítě a v sirupech připravených v laboratoři.
- Pomocí preferenčního testu ohodnotit, který typ sirupu je chutnější a jak velké jsou mezi nimi chuťové rozdíly.
- Doporučit takovou přípravu bezového sirupu, který by obsahoval značný podíl rutinu a zároveň dobře chutnal.
- Na základě obdržených výsledků dát do souvislosti vliv zpracování vzorků na stabilitu rutinu.

Existuje předpoklad, že přidavek malého množství ethanolu by mohl usnadnit extrakci fenolických sloučenin z rostlinného materiálu. Dále předpokládáme, že nebude jednoznačná preference mezi vzorky z čerstvého a sušeného bezu.

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie a standardy

- kyselina mravenčí (Lachema, ČR)
- acetonitril (Merck, Německo)
- kyselina 1 – naftyloctová (Lachema, ČR)
- kyselina L – askorbová (Merck, Německo)
- rutin (Aldrich Chemie, Německo)

Všechny používané chemikálie měly analytickou čistotu. Pro všechny práce byla používána demineralizovaná voda, která byla připravena na zařízení firmy Premier (USA).

3.2 Laboratorní sklo a přístroje

- sada laboratorního skla (Fisher Scientific, Pardubice, ČR)
- analytické váhy AB 204 (Mettler Toledo, Švýcarsko)
- technické váhy Kern (Německo)
- odstředivka Sigma 2 – 5 (Sigma Laborzentrifugen, Německo)
- dávkovač kapalin 5 ml (Sklo Union, ČR)
- pipety automatické, objem 20 – 200 μ l a 100 – 1000 μ l Transferpette (Treff AG, Švýcarsko)
- vodní lázeň termostatovaná míchaná EL – 20 R (Kavalier, ČR)
- SPE izolační jednotka (vývojové dílny JU, ČR)
- filtry ze skleněných vláken GF/C (Whatman, Velká Británie)
- SPE kolonky RP- 18 (Merck, Německo)
- pH – metr Inolab – 1, s elektrodou SenTix 61 (WTW, Německo)
- centrifuga (Hettich Universal 32 R, Německo)
- laboratorní mlýnek (Grindomix GM 200, Německo)
- kombinovaná lednička s chladničkou (Bosch Cooler, Německo)
- teplovzdušná sušárna ULM (Memmert, Německo)

- přístroj pro kapalinovou chromatografii (RRLC) Agilent Technologies, USA, použitá kolona: Agilent SB C18 (50 mm x 4,6 mm, 1,8 µm velikost částic mobilní fáze

3.3 Materiál

Bezové květy pro analýzu byly nasbírány v červnu 2013. Materiál pocházel z volně rostoucích keřů bezu černého. Část byla volně sušena při 25 °C a zpracována podle Českého lékopisu 2009. Druhá část materiálu byla zmrazena při -16 °C. Takto získaný materiál byl použit pro laboratorní přípravu sirupů.

Tab. 1 Rostlinný materiál

sušený květ z černého bezu	mletý (ČL 2009)
čerstvý květ z černého bezu	zmražený

Dále bylo vybráno pět komerčně vyráběných sirupů z obchodní sítě. Podle deklarace výrobce nebyl pro výrobu těchto sirupů použit jen květ z černého bezu.

Tab. 2 Sirupy z obchodní sítě

Obsah vybraných složek na 100 ml			
sirup	extrakt z bezových květů	sacharidy	z toho cukry
YO sirup z bezových květů	neuveďeno	neuveďeno	
JUPÍ sirup černý bez	0,1%	82 g	80 g
GLOBUS sirup bezový květ	0,04%	neuveďeno	
Hamé Bylinný sirup Bezový květ	neuveďeno	69,7 g	68,3 g
Kitl Syrob bezový	neuveďeno	neuveďeno	

Byl stanoven obsah rutinu v obou materiálech květu bezu černého a ve všech zakoupených sirupech.

Tab. 3 Přehled připravených sirupů

Sirup		bez (g)	voda (g)	cukr (g)	ethanol (g)	celkem (g)	% cukru	objem získaného sirupu (ml)
1	čerstvý sach	50,31	80	120		250,31	48	150
2	čerstvý sach + EtOH	50,15	80	120	1	250,15	48	152
3	čerstvý voda	49,49	80	120		249,49	48	164
4	čerstvý voda + EtOH	50,07	80	120	1	250,07	48	168
5	sušený sach	10	120	120		250	48	162
6	sušený sach + EtOH	10	120	120	1	250	48	162
7	sušený voda	10	120	120		250	48	172
8	sušený voda + EtOH	10	120	120	1	250	48	172

3.4 Příprava sirupů z bezových květů

Pracovní postup vycházel z publikované studie (Kaack, 2008). Tento postup byl modifikován podle možností a potřeb výzkumu. V původní publikaci byla použita kyselina sorbová jako konzervační činidlo a tento přídavek byla zachován.

Sirup byl připravován dvěma hlavními způsoby. První cestou byla přímá extrakce cukerným roztokem. Druhou cestou byla extrakce vodou, kdy byl sirup připraven až ze získaného vodného extraktu. Dále byla testována možnost, zda malé množství ethanolu nezvýší významným způsobem množství rutinu v sirupu.

3.4.1 Extrakce cukerným roztokem

Extrakčním činidlem byl 60% sacharózový roztok. Potřebných 1000 g extrakčního činidla bylo připraveno směsí 600 g sacharózy, 10 g 1% kyseliny citrónové, 1 g 0,1% kyseliny sorbové a 389 g vody. Takto připravený roztok byl rozdělen na dvě poloviny. Do jedné poloviny se přidaly 3 ml absolutního ethanolu.

3.4.2 Extrakce vodou

V tomto případě se jedná o vodný extrakt. Požadovaných 1000 g extrakčního činidla vzniklo smísením 10g 1% kyseliny citrónové, 1 g 0,1% kyseliny sorbové a 989 g vody. Jako v předešlém případě toto činidlo bylo následně rozděleno na dvě poloviny. Do jedné poloviny byly přidány 3 ml absolutního ethanolu.

3.4.3 Postup

Zmražený černý bez byl rychle homogenizován a zalitý extrakčním činidlem zahřátým na 70 °C. ⁽³¹⁾

Čerstvý černý bez má sušinu asi 20%. Proto k sušenému materiálu bylo přidáno 40 g vody, aby byl v pokusu zachován celkový obsah vody. Tato směs byla rovněž zalita extrakčním činidlem o teplotě 70 °C.

Po týdně extrakce byl zbytek rostlinného materiálu odstraněn filtrací přes hustou sílonovou tkaninu. Byl odměřen objem získaných sirupů a z vodných extraktů byl připraven sirup smícháním s potřebným množstvím cukru. U hotových sirupů byl stanoven obsah rutinu a byly dále používány pro senzorkou analýzu.

3.5 Metodika stanovení rutinu

Publikované práce (Dádáková, 2008) a (Dádáková & Kalinová, 2010) byly inspirací pro stanovení nejběžnějšího glykosidu kvercetinu-rutinu.

Extrakce a izolace jsou nezbytné první kroky, které je třeba udělat, než se pustíme do chromatografické HPLC detekce. Selektivní izolaci/extrakci je nutné zvolit podle matrice, kterou chceme oddělit. ⁽³²⁾

Tato metoda určená k analýze flavonoidů má dva hlavní izolační kroky, prvním je klasická izolace vodným methanolem a druhým krokem je extrakce pevným sorbentem (SPE). ⁽³²⁾

3.5.1 Stanovení rutinu v sušeném a čerstvém materiálu

Směs přesně asi 0,25 g (na analytických vahách) homogenního rostlinného materiálu, 80 mg kyseliny askorbové, 12,5 ml destilované vody a 12,5 ml methanolu se extrahovala pod zpětným chladičem 1 hodinu na vodní lázni při teplotě 90° C.

Po vychlazení se obsah baňky kvantitativně převedl do odstředivací květy a odstředil se. Pomocí 7,5 ml methanolu a vody se varná baňka vypláchla do květy a tento obsah se opět odstředil (15 min při 3500 otáčkách). Na závěr se sediment promyl vodou a odstředil za stejných podmínek.

Spojené supernatanty v 600 ml kádince se doplnily vodou na 200 ml a pH se upravilo na hodnotu 3 pomocí 1 M HCl. Takto upravený roztok se filtroval přes filtr ze skleněných vláken za sníženého tlaku. Filtrát byl kvantitativně převeden do 500 ml odměrné baňky.

Podle potřeby byl tento roztok naředěn pomocí připraveného 5% roztoku methanolu o hodnotě pH 3,5. Pokud byly použity sušené květy, roztok byl zředěn 50x. V případě použití čerstvého materiálu roztok se ředil 10x. ředění bylo nutné kvůli správné sorpci na SPE kolonkách.

Takto připravený roztok byl použit pro sorpci na tuhé fázi (SPE). Byly použity kolonky RP-18 (Merck), kondicionované promytím 10 ml methanolu a 10 ml vody. Po aplikaci vzorku byla kolonka promyta 10 ml vody a sušena 15 minut procházejícím vzduchem.

Zachycené látky byly eluovány 1,4 ml methanolu do měrné vialky. K eluátu ve vialce se přidal roztok vnitřního standardu (kyselina α -naftyloctová, 2mg/ml) v množství 100 μ l. Takto připravené vzorky byly chromatograficky analyzovány.

3.5.2 Metodika stanovení rutinu v kapalných vzorcích

Směs 1 ml sirupu, 80 mg askorbové kyseliny a 25 ml methanolu v 600 ml kádince byla doplněna destilovanou vodou na 200 ml.

Hodnota pH této směsi se upravila na 3 pomocí 1M roztoku HCl. Roztok byl převeden do 500 ml odměrné baňky. Získaný roztok má složení stejné jako extrakt v předchozí metodice a vhodné pro práci s SPE kolonkami. Dále se s roztokem pracovalo stejně jako v předchozím případě.

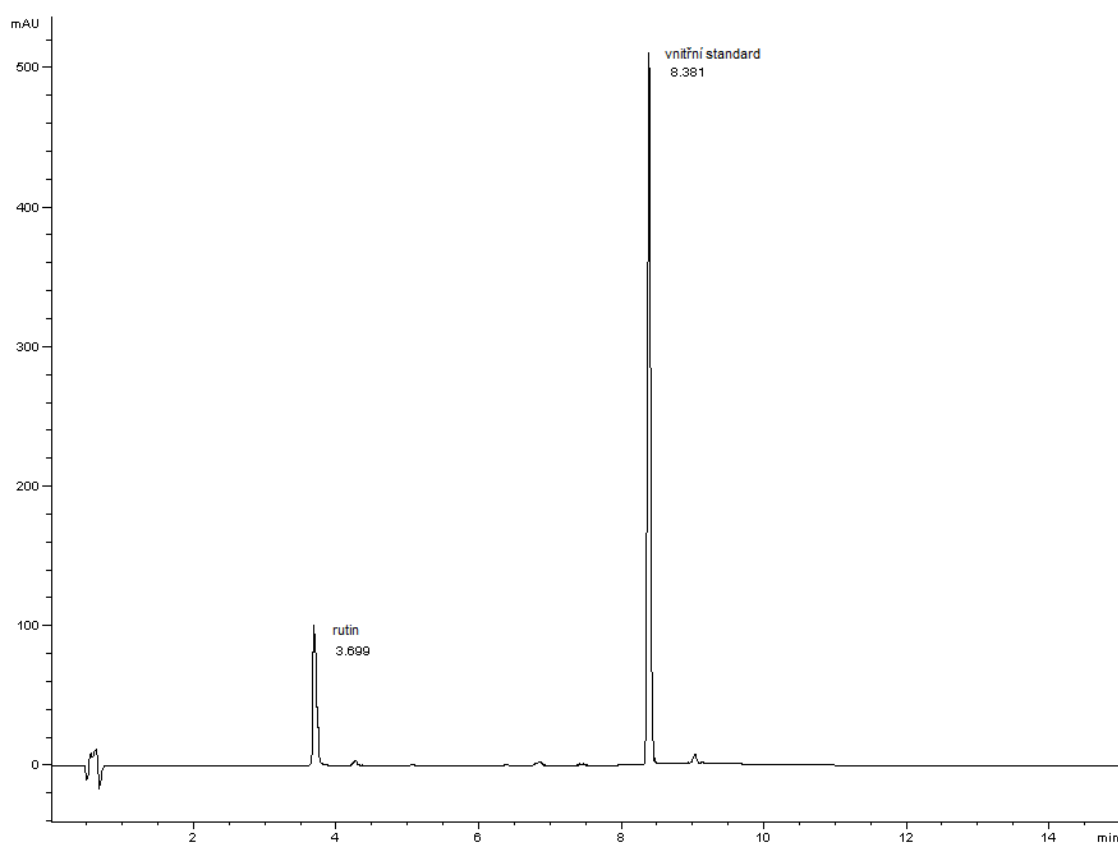
3.5.3 Identifikace rutinu metodou HPLC

Vzorky byly měřeny na kapalinovém chromatografu Agilent 1200 Series Rapid Resolution LC System (Agilent Technologies, USA), byla použita kolona Zorbax SB-

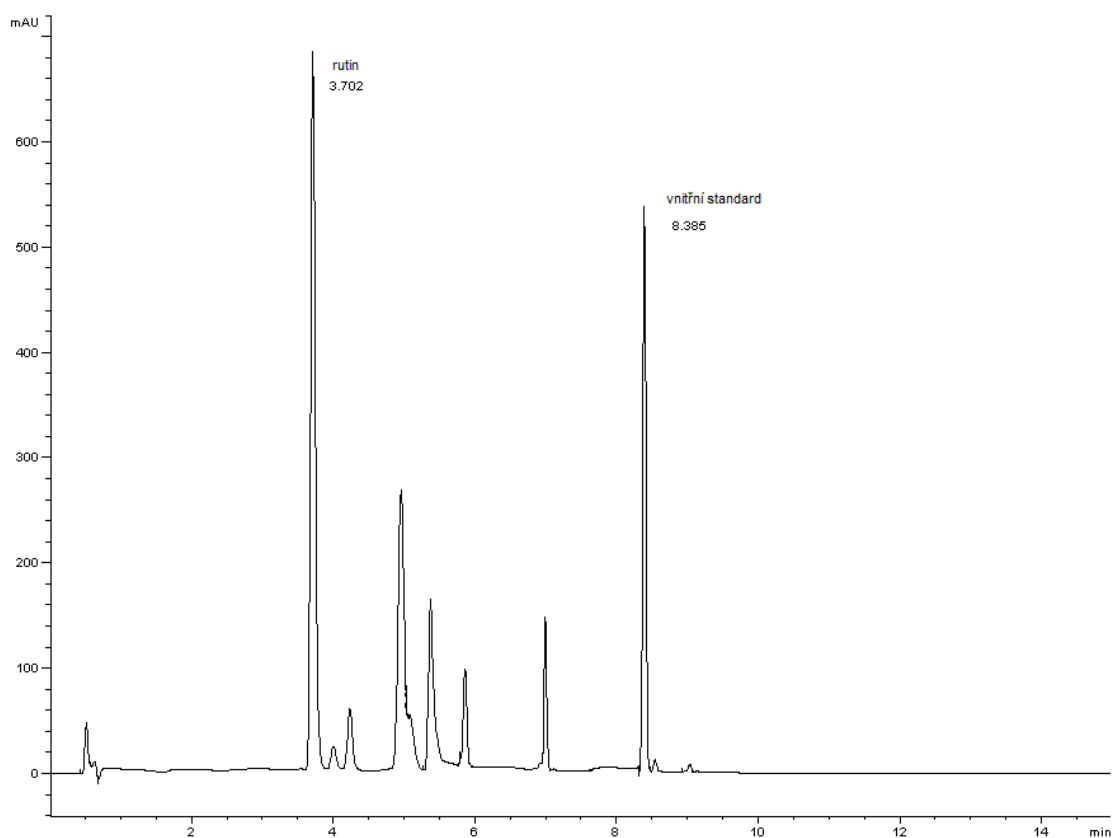
C18 (4,6x50 mm, 1,8 μ m). Pro analýzu byl použit lineární gradient (A: 5% acetonitril, 0,1% kyselina mravenčí, B: 0,1% kyselina mravenčí v acetonitrilu). Schéma gradientu: A/B 0/100 ve 30 minutách. Byl udržován průtok mobilní fáze 1 ml/min, objem nástřiku byl 5 μ l a detekce byla provedena při 270 nm.

Jako analytická odezva je použit poměr ploch píků rutinu a vnitřního standardu. Kvantifikace obsahu rutinu, se provádí pomocí kalibrační závislosti. Roztoky pro sestavení kalibrační závislosti se připravují ze zásobních roztoků podle předpisu.

Detekční limit (LOQ) je 5 mg/kg. Všechny vzorky byly analyzovány dvakrát, uvedené výsledky představují průměr z obou měření s uvedenou odchylkou.



Obr. 15 Chromatografický záznam standardu



Obr. 16 Chromatografický záznam jednoho z měřených vzorků

3.6 Metodika senzoričkého hodnocení

Senzoričké hodnocení bylo provedeno podle podmínek a zásad senzoričkého hodnocení (ČSN ISO 56 0032) ve skupině proškolených studentů (dále jen posuzovatelé), kteří byli seznámeni se zásadami i postupem hodnocení. Počet posuzovatelů je znázorněn v tabulce č. 4.

Tab. 4 Počet posuzovatelů při párové preferenční zkoušce

ženy		muži		celkem	
n	%	n	%	n	%
23	57,5	17	42,5	40	100

3.6.1 Postup provedení

Především bylo třeba zajistit dostatečné množství vzorku pro všechny posuzovatele. Testované vzorky byly vytvořeny z připravených sirupů zředěním nesyčenou stolní vodou v poměru 1:10.

Dvojice vzorků se předkládala současně ve stejném množství, ve stejné nádobě a jejich teplota musela být pokudmožno stejná, aby posuzovatelé nemohli činit závěry o vlastnostech vzorků ze způsobu jejich překládání ⁽¹³⁾

Posuzovatelé měli za úkol podle zásad normy (ČSN 56 0032) vybrat vždy z předložené dvojice jeden vzorek, který preferují. Jedná se o techniku tzv. „nucené volby.“ Měli také napsat, jak velký rozdíl vnímají mezi oběma předloženými vzorky. Předloženou dvojici vždy tvořil jeden sirup připravený z čerstvého černého bezu a jeden vyrobený ze sušených květů černého bezu.

Výsledky párového preferenčního oboustranného testu byly zpracovány pomocí normy ČSN 56 0032 upravující párovou porovnávací zkoušku.

3.7 Použité programy

Naměřená data byla vyhodnocena pomocí programů ChemStation 3D (Agilent Technologies) a MS Office Excel (Microsoft) a jeho statistické nástroje.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Obsah rutinu v sušeném a čerstvém materiálu

Jak už z názvu vyplývá k analýze byla určena metodika stanovení rutinu v sušeném a čerstvém materiálu.

Tab. 5 Naměřené hodnoty koncentrace v čerstvém a sušeném bezu

	navážka (g)	koncentrace (mg/kg)	odchylka
čerstvý bez	0,2811	3210	28
	0,2638		
sušený bez	0,2538	23350	71
	0,2502		

Několikanásobně vyšší obsah rutinu byl naměřen v sušeném černém bezu. V průběhu skladování došlo ke změnám obsahu rutinu. V čerstvém materiálu byl rutin degradován daleko rychleji než v sušeném.

Pro srovnání obdržená koncentrace rutinu v sušeném černém koresponduje s výsledky (Dadáková, 2011), naměřená koncentrace činila 19800 mg/kg. Podmínky sušení byly podobné.

4.2 Obsah rutinu v sirupech

Pro analýzu sirupů byla použita metodika stanovení rutinu v kapalných vzorcích.

Tab. 6 Naměřená koncentrace rutinu v komerčních bezových produktech

sirup	navážka (ml)	koncentrace (mg/l)	odchylka
YO sirup z bezových květů	1	< LOQ ¹	-
JUPÍ sirup černý bez	1	< LOQ	-
GLOBUS sirup bezový květ	1	< LOQ	-
Hamé Bylinný sirup Bezový květ	1	38,3	2
Kitl Syrob bezový	1	167	8

Z komerčních produktů nejlépe dopadl Kitl Syrob bezový s koncentrací rutinu 167 mg/l. Za ním následoval Hamé Bylinný sirup Bezový květ. U ostatních sirupů bylo množství rutinu pod mezí stanovitelnosti metody.

Tab. 7 Obsah a výtěžnost rutinu v připravených sirupech

sirup	objem (ml)	koncentrace (mg/l)	rutin v bezu (mg)	rutin v sirupu (mg)	%
1	150	458	161	69	42
2	152	368	161	56	35
3	164	467	159	77	48
4	168	367	161	62	38
5	162	934	234	151	65
6	162	920	234	149	64
7	172	729	234	125	54
8	172	740	234	127	55

Největší koncentrace rutinu byly zjištěny u sirupů připravených z květů sušeného černého bezu metodou extrakce cukerným roztokem. Dále se umístily sirupy vyrobené ze sušeného bezu za použití metodiky extrakce vodou. Nejnižší obsahy rutinu byly naměřeny u vzorků sirupů připravených z čerstvého černého bezu. Z tabulky dále vyplývá, že přidávaný ethanol (sirupy č. 2, 4, 6 a 8) neměl významný vliv na obsažené množství rutinu v sirupech.

¹ LOQ (limit of quantification) – mez stanovitelnosti, 2mg/l

Porovnáme-li výsledky z tabulky č. 6 a č. 7, zjistíme, že sirupy připravené v laboratoři obsahovaly jednoznačně větší množství rutinu než sirupy, které pocházely z obchodní sítě.

V žádném ze zakoupených ani připravených sirupů nebyl nalezen volný kvercetin.

Tab. 8 Ztráty rutinu při zpracování sirupů v laboratoři

sirup	ztráty (mg)	%
1	93	58
2	105	65
3	82	52
4	99	61
5	82	35
6	85	36
7	108	46
8	106	45

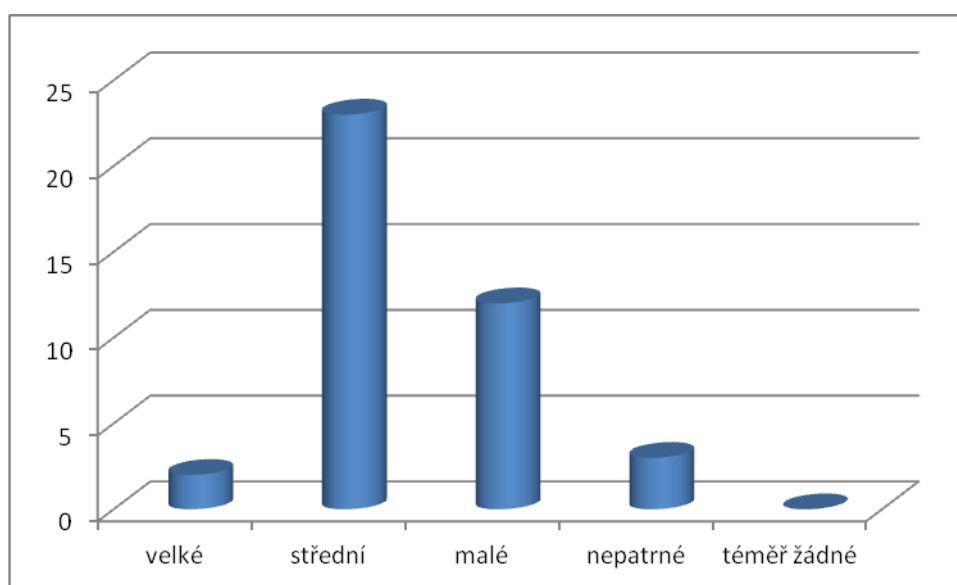
Sirupy 1-4 byly vyrobeny z čerstvého černého bezu, ztráty rutinu se pohybovaly v rozmezí 52-65%. Sirupy 5-8 ze sušeného černého bezu měly poměrně nižší ztráty rutinu při zpracování, pohybovaly se v rozmezí 35-46%. Z tabulky plyne, že sušený černý bez byl při zpracování stabilnější.

4.3 Výsledky senzorické analýzy

Tab. 9 Senzorické hodnocení preference

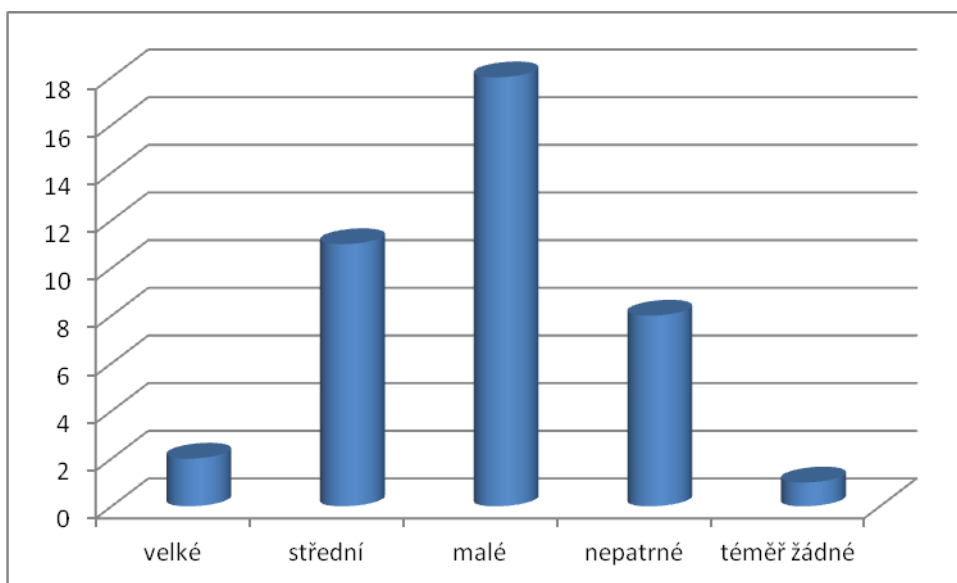
	Dvojice 1-5		Dvojice 2-6		Dvojice 3-7		Dvojice 4-8	
	Sirup 1	Sirup 5	Sirup 2	Sirup 6	Sirup 3	Sirup 7	Sirup 4	Sirup 8
Počet preferenčních hodnocení	16 40%	24 60%	18 45%	22 55%	7 17,5%	33 82,5%	13 32,5%	27 67,5%
Počet hodnocení celkem	40 100%		40 100%		40 100%		40 100%	
Hladina významnosti	> 0,05		> 0,05		< 0,05		< 0,05	

Vzhledem k tomu, že počet minimálně kladných odpovědí u zkoušených dvojic 1-5 a 2-6 byl menší než 27, nebyla zjištěna statisticky významná preference sirupů ze sušených bezových květů před čerstvým bezem. Naproti tomu počet preferencí sirupu č. 7 u zkoušené dvojice 3-7 byl větší než 27, a počet kladných odpovědí u sirupu č. 8 byl roven 27. U těchto dvou dvojic byla zjištěna statisticky významná přednost sirupů ze sušeného černého bezu.



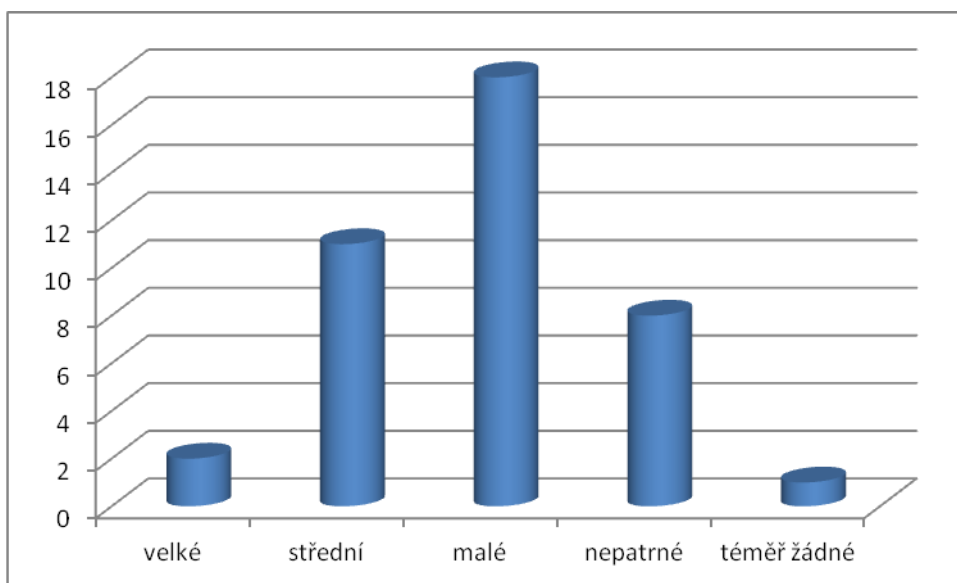
Obr. 17 Vnímané rozdíly mezi sirupy 1 a 5

Z grafu je patrné, že mezi vzorky 1 a 5 existují jisté rozdíly. Nejčastější odpovědi hodnotitelů byla volba středních rozdílů.



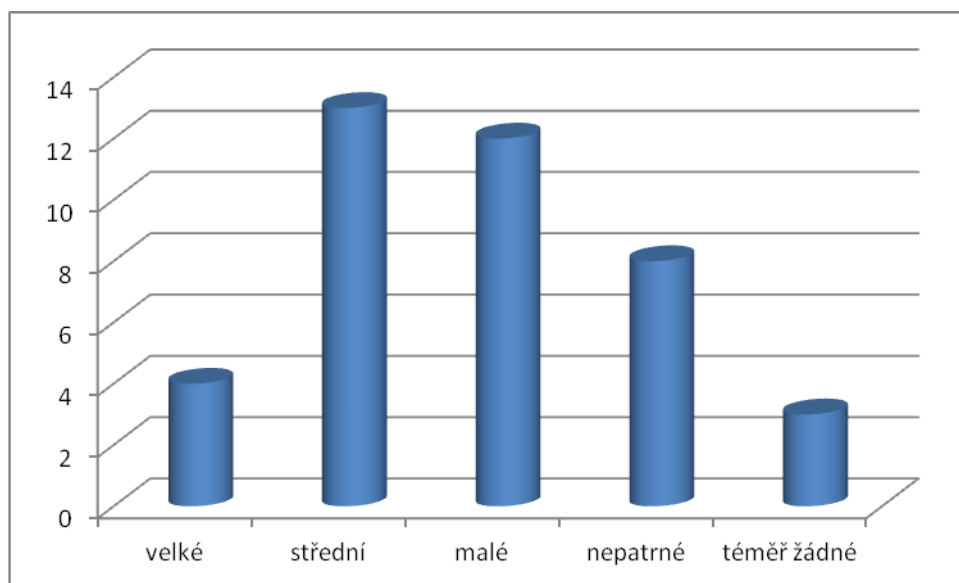
Obr. 18 Vnímané rozdíly mezi sirupy 2 a 6

Mezi sirupy 2 a 6 se dle názoru hodnotitelů vyskytovaly převážně malé rozdíly v chuti analyzovaných vzorků.



Obr. 19 Vnímané rozdíly mezi sirupy 3 a 7

Při posuzování rozdílu mezi vzorky 3 a 7 hodnotitelé nejčastěji uvedli, že rozdíly mezi hodnocenými vzorky jsou malé.



Obr. 20 Vnímané rozdíly mezi sirupy 4 a 8

Z grafu vyplývá, že posuzovatelé vnímali mezi sirupy 4 a 8 střední až malé rozdíly. Avšak nejčastější odpovědí byly střední rozdíly.

5 Závěr

Závěry vyplývající z této bakalářské práce lze shrnout takto:

Obsah rutinu byl měřen v čerstvém a sušeném květenství černého bezu, dále v pěti bezových sirupech, které pocházeli z obchodní sítě a v osmi sirupech připravených v laboratoři. Na závěr byla provedena senzorická analýza sirupů připravených v laboratoři. Jejímž úkolem bylo z předložené dvojice vzorků vybrat jeden, který preferují a zaznamenat jak velké chuťové rozdíly mezi danými vzorky vnímají.

Průměrná koncentrace rutinu v čerstvém rostlinném materiálu činila 3 210 mg/kg. Sušený rostlinný materiál obsahoval v průměru 23 350 mg/kg rutinu.

Z komerčních sirupů nejvíce rutinu obsahoval Kitl Syrob Bezový (167 mg/l) a Hamé Bylinný sirup Bezový květ (38,3 mg/l). Množství rutinu u ostatních sirupů bylo pod mezí stanovitelnosti.

Sirupy připravené v laboratoři obsahovaly daleko více rutinu. Koncentrace rutinu v sirupech vyrobených z čerstvého bezu se pohybovala v rozmezí 367-458 mg/l. U sirupů přichystaných ze sušených květů se koncentrace rutinu nacházela v intervalu 729-934 mg/l.

Z hlediska stability pro zpracování je vhodnější sušený materiál, neboť vykazoval menší ztráty rutinu (35-46%) než čerstvý černý bez (52-65%). Nejnižších ztrát bylo dosaženo u sirupů, kde jako extrakční činidlo byl použit 60% sacharózový roztok.

Výsledky párového preferenčního oboustranného testu ukázaly, že u předložených dvojic tvořených vždy čerstvým a sušeným bezem posuzovatelé preferovali ve dvou případech sirupy ze sušených květů černého bezu a u dvou hodnocených párů výsledky nebyly statisticky průkazné.

Neprůkazné rozdíly byly zjištěny u sirupů připravených extrakcí cukerným roztokem, kde posuzovatelé vnímali převážně střední a malé rozdíly v chuti u předložených vzorků. U sirupů vyrobených pomocí extrakce vodou byla zjištěna preference vzorků připravených ze sušených květů černého bezu. Posuzovatelé opět pocítovali malé a střední rozdíly.

Z výše shrnutých výsledků vyplývá, že pro výrobu sirupů je lepší použít sušené květy černého bezu. Sirupy připravené ze sušeného materiálu obsahovaly vyšší podíl rutinu, byly stabilnější při zpracování a lépe chutnaly. Jako extrakční činidlo je vhodné použít 60% sacharózový roztok, neboť při jeho použití bylo dosaženo nejnižších ztrát rutinu. Zda-li se přidá etanol, není podstatné, neboť neměl zásadní vliv na stabilitu rutinu.

Volný kvercetin nebyl nalezen v žádném z analyzovaných sirupů, ať už komerčně vyráběných nebo připravovaných v laboratoři.

6 Seznam informačních zdrojů

1. JANČA, J.; ZENTRICH, J. A. *Herbář léčivých rostlin: 1. díl*. 1. vyd. Praha: EMINENT, 1994, 224-227. ISBN 80-85876-02-7.
2. JIRÁSEK, V.; STARÝ, F.. *Atlas léčivých rostlin*. 1. vyd. Praha: SPN, 1986, s. 368
3. VEBERIC, R. et al. European elderberry (*Sambucus nigra* L.) rich in sugars, organic acids, anthocyanins and selected polyphenols. *Food Chemistry*. 2009, 114, 511-515.
4. Dostupné z:
<http://web.vscht.cz/~koplikr/Rostlinn%C3%A9%20fenoly%20a%20flavonoidy.pdf>, staženo dne 17. 1. 2014
5. SLANINA, J.; TÁBORSKÁ, E. Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. *Chem. Listy*. 2004, 98, 239-245
6. VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 3. díl*. 2. vyd. Tábor: OSSIS, 2002, s. 19-35. ISBN 80-86659-03-8
7. DRBAL, K.; Křížek, M. *Analytická chemie*, České Budějovice: ZF JU České Budějovice, 1999, 159-173
8. ŠTULÍK, K. et al. *Analytické separační metody*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004, s. 136-137. ISBN 80-246-0852-9.
9. KREJČÍ, Z. *Obsah vybraných fenolických látek v léčivých rostlinách*. [Diplomová práce]. České Budějovice, Jihočeská univerzita, Pedagogická fakulta, 2007, 9-11
10. PIETTA, P. Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*. 2000, 63, 1035-1042
11. HOLLMAN, Peter C. H.; HERTOOG, M.; KATAN, M. Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chemistry*. 1996, 57, 43-46
12. DADÁKOVÁ, E.; KALINOVÁ, J. Determination of quercetin glycosides and free quercetin in buckwheat by capillary micellar electrokinetic chromatography. *J. Sep. Sci.* 2010, 33, 1633-1638

13. ČSN 56 0032 část 1. *Senzorická analýza – Metodologie Párová porovnávací zkouška*. Praha: Federální úřad pro normalizaci a měření, 1990, 1-7
14. BLECHOVÁ, R. *Senzorické hodnocení vybraných druhů sýrů s plísní na povrchu*. [Bakalářská práce]. České Budějovice, Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, 2013, 9
15. RUSSO, M. et al. The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: Facts and figures. *Biochemical Pharmacology*. 2012, 83, 6-15
16. ÜRGEOVÁ, E.; POLÍVKA, Ľ.; PŠENÁKOVÁ, I. Flavonoidy-Rastlinné metabolity s biologickými účinkami. *SLOVAK JOURNAL OF HEALTH SCIENCE*. 2010, 1, 36-43
17. CHURÁČEK, J. et al. *Analytická separace látek*: Praha, SNTL, 1990, 203- 213. ISBN 80-03-00569-28
18. FIDLER, M.; KOLÁŘOVÁ, L. Analýza antioxidantů v chmelu a pivu. *Chemické Listy*. 2009, 103, 232-235.
19. OPEKAR, F. et al. *Základní analytická chemie: pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. 1. vyd. Praha, Karolinum, 2003, 165-169. ISBN 80-246-0553-8.
20. ZLOCH, Z. Zdravotní efekt polyfenolů z hlediska jejich příjmu a využitelnosti. *Vojenské zdravotnické listy*. 2005, 5, 226-229
21. CALDERÓN-MONTAÑO; J. M. A Review on the Dietary Flavonoid Kaempferol. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2011, 11, 298-344
22. CHRISTENSEN, L. P.; KAACK, K; FRETTE, X. C. Selection of elderberry (*Sambucus nigra* L.) genotypes best suited for the preparation of elderflower extracts rich in flavonoids and phenolic acid. *Eur Food Res Technol*. 2008, 227, 293-305
23. DADÁKOVÁ, E. et al. The stability of rutin and chlorogenic acid during the processing of black elder (*Sambucus nigra*) inflorescence. *Acta Alimentaria*. 2011, 40, 327-334
24. ROSCHEK, B. et al. Elderberry flavonoids bind to and prevent H1N1 infection *in vitro*. *Phytochemistry*. 2009, 70, 1255-1261

25. WERLEIN, H.-D. et al. Influence of elderberry and blackcurrant concentrates on the growth of microorganisms. *Food Control*. 2005, 16, 729-733
26. FRESCO, P. et al. New Insights on the Anticancer Properties of Dietary Polyphenols. *Medical Research Reviews*. 2006, 26, 747-766
27. SPENCER, J.; ABD EL MOHSEN, M.; RICE-EVANS, C. Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2004, 423, 148-161
28. HOHNOVÁ, B. *Studium přírodních látek obsažených ve vybraných bylinách a méně obvyklých druzích drobného ovoce*. [Disertační práce]. Brno, Vysoké učení technické, Chemická fakulta, 2010, 9-10
29. Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/9/512/figure/F5?highres=y>, staženo dne 24. 3. 2014
30. POKORNÝ, J.; VALENTOVÁ, H.; PANOVSÁ, Z. *Senzorická analýza potravin*. Praha, VŠCHT, 1999, 9-10. ISBN 80-7080-329-0
31. KAACK, K. Processing of aroma extracts from elder flower (*Sambucus nigra* L.). *Eur Food Res Technol*. 2008, 227, 376-390
32. MOLNÁR-PERL, I.; FÜZHAI, ZS. Chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrochromatographic techniques in the analysis of flavonoids. *Journal of Chromatography A*. 2005, 1073, 201-227

Obrázky převzaté z internetu

33. Obr. 13 Černý bez (stažen 28.1.2014: http://www.e-rimbaba.cz/cz_bez-cerny,190.html)

7 Přílohy

Příloha č. 1 Senzorické hodnocení sirupů z květů černého bezu

SENZORICKÉ HODNOCENÍ BYLINNÝCH SIRUPŮ

Jméno :

Datum :

Ročník a skupina :

Úkol : Hodnocení sirupu párovým preferenčním testem

Ochutnejte první předložený vzorek, vypláchněte si ústa a po 30 s ochutnejte stejné množství druhého vzorku. Rozhodněte potom, kterému vzorku dáváte přednost (který vzorek je chutnější) a výsledek zapište do tabulky. Ochutnávání se může opakovat libovolně často, ale vzhledem k únavě je vhodnější vystačit s co nejnižším počtem ochutnávek.

Zkoušená dvojice 1-5:

Preferuji vzorek č.	Mezi vzorky jsou rozdíly:
	velké střední malé nepatrné téměř žádné

Zkoušená dvojice 2-6:

Preferuji vzorek č.

Mezi vzorky jsou rozdíly:
velké střední malé nepatrné téměř žádné

Zkoušená dvojice 3-7:

Preferuji vzorek č.

Mezi vzorky jsou rozdíly:
velké střední malé nepatrné téměř žádné

Zkoušená dvojice 4-8:

Preferuji vzorek č.

Mezi vzorky jsou rozdíly:
velké střední malé nepatrné téměř žádné