



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

## **Biologicky aktivní fenolické látky v drobném ovoci**

Autor: Bc. Lenka Laxová

Školitel: doc. Ing. Eva Dadáková, Ph. D.

České Budějovice 2017

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lenka LAXOVÁ**  
Osobní číslo: **P15300**  
Studijní program: **N7503 Učitelství pro základní školy**  
Studijní obory: **Učitelství chemie pro 2. stupeň základních škol**  
**Učitelství přírodopisu pro 2. stupeň základních škol**  
Název tématu: **Biologicky aktivní fenolické látky v drobném ovoci.**  
Zadávající katedra: **Katedra aplikované chemie**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

- 1) Vypracujte literární rešerši zaměřenou na rostlinné fenolické látky, jejich výskyt v potravinách a důležitost ve výživě se zaměřením na drobné ovoce.
- 2) Pořídte vzorky vybraných druhů drobného ovoce pěstovaného v České republice, získaný materiál použijte pro modelové kuchyňské úpravy.
- 3) U těchto vzorků stanovte obsah vybraných fenolických látek metodou HPLC.
- 4) Vyhodnoťte získané výsledky.

Drobné ovoce je oblíbenou sezónní potravinou, která vedle tradičních komerčně pěstovaných druhů obohacuje běžný jídelníček. Botanicky patří do různých botanických čeledí a konzumovanou částí těchto rostlin jsou plody.

Drobné ovoce se konzumuje nejčastěji v čerstvém stavu nebo se využívá jako surovina pro přípravu jednoduchých ovocných konzerv (sirup, marmeláda) zejména v domácích podmínkách. Díky obsahu biologicky aktivních sloučenin představuje výživově cenný příspěvek k potravě. Některé obsahové látky, zejména rostlinné polyfenoly, mají intenzivní antioxidační účinky a mohou přispět k prevenci civilizačních onemocnění (onemocnění srdce a cév, rakovina). Cílem diplomové práce bude zjistit obsah vybraných fenolických látek (flavonoidy, fenolické kyseliny) ve vybraných druzích drobného ovoce a prozkoumat změny obsahu těchto sloučenin v závislosti na běžných způsobech kuchyňské úpravy.


Rozsah grafických prací: **podle potřeby výsledků**  
Rozsah pracovní zprávy: **50 stran**  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**  
Seznam odborné literatury:

1. Liu E.H., Qi L.W., Cao J., Li P., Li C.Y., Peng Y.B. (2008): Advances of modern chromatographic and electrophoretic methods in separation and analysis of flavonoids. *Molecules*. 13, 2521-2544.
2. Andersen M., Markham K.R. (2006): Flavonoids - Chemistry, Biochemistry and Applications. CRC, Taylor and Francis.
3. Velíšek J., Hajšlová J. (2009): Chemie potravin. Osis Tábor, ISBN 978-80-86659-17-6.
4. Žďárek J. (2002): Fyziologické a ekologické funkce přírodních látek. In: Chemie a biochemie přírodních látek, ÚOCHB, Praha, ISBN 80-86241-17-3.
5. Kubát K., Hrouda L., Chrtěk J. jun., Kaplan Z., Kirschner J. & Štěpánek J. (2002): Klíč ke květeně České republiky, Academia, Praha, ISBN 80-200-0836-5.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Eva Dadáková, Ph.D.**  
Katedra aplikované chemie  
Konzultant diplomové práce: **Ing. Štěpánka Chmelová, Ph.D.**  
Katedra biologie  
Datum zadání diplomové práce: **5. listopadu 2015**  
Termín odevzdání diplomové práce: **15. dubna 2017**

  
Mgr. Michal Vančura, Ph.D.  
děkan



  
prof. Ing. Martin Křížek, CSc.  
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 5. listopadu 2015

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji diplomovou 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 15. 12. 2017

.....  
Lenka Laxová

## **Poděkování**

Práce byla vypracována s podporou grantu GAJU 112/2016/Z a za finanční podpory MŠMT v rámci programu NPU I, projekt LO1608 "Výzkumné ovocnářské centrum". Byla rovněž využita infrastruktura programu CZ.1.05/2.1.00/03.0116.

Mé poděkování patří paní doc. Ing. Evě Dadákové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a cenné rady, které mi v průběhu zpracování diplomové práce věnovala. Děkuji také paní Ing. Tamaře Pelikánové za pomoc při praktickém provedení experimentů. Panu Ing. Aleši Matějčkoví, Ph.D. patří poděkování za cenné rady.

## **Abstrakt**

Diplomová práce se zabývá sledováním vybraných biologicky aktivních látek v drobném ovoci během jeho zpracování. Modelovým druhem drobného ovoce byl zvolen bez černý (*Sambucus nigra L.*), který je v lidovém léčitelství známý svými léčivými účinky a značným obsahem účinných biologicky aktivních látek.

Plody bezu černého byly upraveny modelovými kuchařskými úpravami. U výsledných produktů byl zjišťován obsah vybraných fenolických látek (chlorogenová kyselina, kvercetin, rutin, anthokyany). V doplňkovém stanovení byl stanoven obsah askorbové kyseliny.

Na základě experimentálního stanovení bylo zjištěno, že nejvíce jsou ve výrobcích bezinek zastoupena anthokyanová barviva a rutin. Všechny analyty ve výchozích surovinách i výrobcích z bezu s postupnými úpravami a dlouhodobým skladováním ubývaly. Naopak obsah kvercetinu se s postupnými úpravami a skladováním zvyšoval. Největší pokles hodnot byl zaznamenán u vitamínu C. Nejnižších hodnot ve výrobcích z bezinek dosahoval kvercetin a askorbová kyselina.

## **Klíčová slova**

Bez černý, *Sambucus nigra L.*, rutin, kvercetin, chlorogenová kyselina

## **Summary**

This master's thesis focuses at bioactive compounds in edible berries during its culinary processing. Elderberries (*Sambucus nigra L.*) were selected as a representative of edible berries variety. Elderberry is known for presence of significant bioactive compound content and usage in traditional medicine.

Elderberries were processed according to common culinary recipes. Amount of selected bioactive polyphenolic compounds (chlorogenic acid, quercetin, rutin, anthocyanes) was detected accordingly. Additionally content of ascorbic acid was determined.

On the basis of the experimental determination, it was found that anthocyanes and rutin are the most common compounds found in elderberries. All analytes in juices and sirups gradually decreased during the culinary treatments and long-term storage. On the contrary, the content of quercetin increased with gradual modifications and storage. The highest decrease was observed for vitamin C content. The lowest values in the elderberries products were reached by two monitored compounds - quercetin and ascorbic acid.

## **Key words**

Black elder, *Sambucus nigra L.*, rutin, quercetin, chlorogenic acid

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod .....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>Literární přehled.....</b>	<b>11</b>
2.1	Biologicky aktivní fenolické látky .....	11
2.1.1	Fenolické látky v rostlinách – charakteristika a výskyt .....	11
2.1.2	Příjem rostlinných fenolických látek .....	12
2.1.3	Aktivita rostlinných fenolických látek v metabolismu .....	13
2.2	Rozdělení rostlinných fenolických látek .....	14
2.3	Charakteristika vybraných zástupců biologicky aktivních a fenolických látek .....	14
2.3.1	Flavonoidy .....	14
2.3.1.1	<i>Anthokyany</i> .....	15
2.3.2	Flavonoly .....	16
2.3.2.1	<i>Kvercetin</i> .....	16
2.3.2.2	<i>Rutin</i> .....	17
2.3.3	Fenolické kyseliny .....	18
2.3.3.1	<i>Chlorogenová kyselina</i> .....	19
2.3.4	Vitamín C .....	19
2.4	Drobné ovoce charakteristika a zastoupení .....	20
2.5	Význam konzumace ovoce.....	20
2.6	Bez černý ( <i>Sambucus nigra</i> L.) .....	21
2.6.1	Botanická charakteristika .....	22
2.6.2	Pěstování, kulturní odrůdy, plané odrůdy .....	23
2.6.3	Obsahové látky v bezu černém .....	23
2.6.4	Tradiční použití a kuchyňské úpravy .....	24
2.7	Analytické metody .....	25
2.7.1	Extrakce na pevné fázi (SPE).....	25
2.7.2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	26
2.7.3	Spektrofotometrie UV/ VIS .....	26
<b>3</b>	<b>Cíle práce .....</b>	<b>28</b>
<b>4</b>	<b>Materiál a metody .....</b>	<b>29</b>
4.1	Materiál .....	29
4.1.1	Odběr vzorků bezu černého .....	29
4.1.1.1	<i>Surovina pro získání šťávy</i> .....	30
4.1.1.2	<i>Lisování šťávy</i> .....	30



4.2	Chemikálie a přístroje .....	31
4.2.1	Chemikálie .....	31
4.2.2	Přístroje a pomůcky.....	31
4.3	Metody.....	33
4.3.1	Stanovení obsahu celkových anthokyanů .....	33
4.3.2	Stanovení obsahu vitamínu C. ....	33
4.3.3	Stanovení obsahu rutinu, kvercetinu a chlorogenové kyseliny.....	34
<b>5</b>	<b>Výsledky a diskuze.....</b>	<b>36</b>
5.1	Stanovení obsahu celkových anthokyanů.....	37
5.2	Stanovení obsahu vitamínu C.....	39
5.3	Sledované fenolické látky .....	42
5.4	Stanovení obsahu rutinu. ....	43
5.5	Stanovení obsahu kvercetinu.....	45
5.6	Stanovení obsahu chlorogenové kyseliny. ....	47
<b>6</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>Literatura .....</b>	<b>51</b>
<b>8</b>	<b>Přílohy.....</b>	<b>57</b>
8.1	Použité zkratky .....	57

# 1 Úvod

Ovoce, tedy jedlé plody ovocných rostlin, se v dnešní době těší velké oblibě. Má význam národohospodářský, estetický a především zdravotní. Nejčastěji je ovoce využíváno ke konzumaci v rozličných formách jako potravina. Pěstováno je v podobě ovocných stromů či keřů. Pomologicky jsou ovocné druhy rostlin děleny na několik skupin - jádroviny, peckoviny, skořápkaté ovoce a drobné ovoce.

Právě drobné ovoce je zastoupeno určitým množstvím botanických čeledí a rodů. Zpravidla se jedná o plody mající podobu malých bobulí, souplodí či plodenství. Díky své sensoricky příjemné barvě, chuti a vůni nám často zpestřují jídelníček. Nutričně jsou velmi významným zdrojem zdraví prospěšných látek.

Konzumace ovoce je všeobecně vnímána jako zdraví prospěšná a přispívá ke snížení rizika výskytu mnoha onemocnění. V ovoci jsou zastoupeny sacharidy, bílkoviny, tuky, vitamíny, aromatické látky, minerální látky, třísloviny a jiné zdraví prospěšné látky. Drobné ovoce je bohaté na obsah biologicky aktivních fenolických látek, flavonoidů, vitamínu C a antokyanů. Výše zmíněné látky jsou pro metabolismus člověka významné, jelikož tyto látky neumíme na rozdíl od rostlin syntetizovat.

Příkladným zástupcem drobného ovoce z čeledi *Adoxaceae* je bez černý (*Sambucus nigra*, L.), který je v České republice velmi hojně rozšířen jako volně rostoucí rostlina a je pěstován i v podobě kulturních odrůd.

Drobné ovoce je bohužel sezónní záležitostí, která neumožňuje celoročně konzumovat ovoce pouze v čerstvé a syrové podobě, kdy obsahuje nejvíce prospěšných látek. Nastává tedy nutnost zpracovat čerstvé ovoce do produktů s delší trvanlivostí umožňující skladování. Sezónní ovoce zpracovává do šťáv, sirupů, kompotů, džemů či jiných domácích polokonzerv.

Při kuchyňských úpravách drobného ovoce mají správný postup při přípravě polokonzerv, přidané ingredience, konzervanty a délka skladování vliv na rychlost úbytku prospěšných látek.

## **2 Literární přehled**

### **2.1 Biologicky aktivní fenolické látky**

Biologicky aktivními látkami jsou označovány takové chemické sloučeniny, které působí na životní funkce organismů. Mohou působit na biochemické pochody v organismech, ovlivňují průnik látek buňkami a mohou mít vliv na koordinační funkce živých organismů (Waisser, 2004). V širším slova smyslu bychom za tyto látky mohli považovat všechny sloučeniny od vody po aminokyseliny. Důraz je však kladen na slovo aktivní, což znamená, že jde o látky vykonávající, respektive podněcující určitou činnost organismu (Dřimalová, 2005).

Člověk přijímá biologicky aktivní sloučeniny v potravě. Kromě základních živin, jako jsou sacharidy (cukry), proteiny (bílkoviny) a lipidy (tuky) jsou potraviny nutričně významné i z hlediska jiných obsahových látek (Kastnerová, 2014).

Mnoho látek a sloučenin musí být přijímáno v potravě, jelikož je lidský organismus není schopen syntetizovat. Fenolické látky jsou rostlinného původu, vyskytují se tedy v potravinách rostlinného původu přirozeně. V potravinách se uplatňují jako barviva nebo jinak senzory významné látky. Některé fenolické látky ovlivňují redoxní děje v organismu a řadíme je tudíž mezi antioxidanty (Velíšek, 2002a).

#### **2.1.1 Fenolické látky v rostlinách – charakteristika a výskyt**

Fenolické či polyfenolické rostlinné látky náleží do různorodé skupiny sekundárních metabolitů rostlin (Fresco, 2006). Jsou to sloučeniny obsahující jednu nebo několik hydroxylových funkčních skupin vázaných na aromatické jádro, či více aromatických jader (Harmatha, 2005). Rostlinné polyfenoly lze dělit do několika skupin - fenolické kyseliny a jejich analogy, stilbeny, flavonoidy a jejich analogy a ostatní polyfenoly (Fresco, 2006). Nejběžněji zastoupenými rostlinnými polyfenoly jsou flavonoidy, fenolové kyseliny a lignany (Slanina, 2004).

Rostliny vytváří řadu sekundárních metabolitů, které je chrání před stresem různého původu. Stresovými faktory mohou být například predace, mikrobiální infekce či ultrafialové záření. Dle biosyntetických drah vzniku a struktury můžeme sekundární metabolity rostlin dělit na tři skupiny. Terpenoidy, alkaloidy a fenolické sloučeniny (Ioannou, 2012). Rostlinné fenolické látky se vytváří jednou ze dvou

klíčových drah, které vedou k tvorbě aromatických sloučenin a to běžně přes šikimáty či méně často polyacetátovou biosyntézou (Míka, 2001).

Rostlinné fenoly vytváří velmi pestrá skupinu sloučenin, jež je z chemického hlediska velice heterogenní (Fresco et al., 2006). V rostlinách se flavonoidy vyskytují většinou v podobě  $\beta$ -glykosidů. Sacharidovou složkou je nejčastěji glukosa či rhamnosa. Nejčastěji je připojen jeden glykosyl, jindy má polyfenol substituovány dva nebo tři hydroxyly. Sacharidová složka či aglykon mohou být ještě substituovány některou hydroxykyselinou, např. kyselinou jablečnou nebo galovou (Slanina a Táborská, 2004).

Pro některé druhy potravin byly naměřeny průměrné hodnoty celkového obsahu polyfenolů. Tyto hodnoty však nemohou být brány jako směrodatné. Obsah polyfenolů se mezi odrůdami jednoho druhu ovoce, například jablek, může značně rozcházet (Hammerstone et al., 2000). Distribuce fenolických látek se v různých částech rostlin a jejich plodů také značně liší. Zpracování či oddělování částí potravin může vést k ochuzení nebo naopak obohacení o určité fenolické látky. Například jablečná slupka obsahuje kvercetin (1mg/g čerstvé váhy), oloupané jablko pak neobsahuje žádné další flavonoly (Burda et al., 1990).

### **2.1.2 Příjem rostlinných fenolických látek**

Rostlinné polyfenoly jsou nejrozšířenějšími sloučeninami v naší stravě, které vstupují do redoxních dějů. Jejich denní příjem byl odhadnut až na 1 g a je tedy výrazně vyšší, než je příjem antioxidantních vitamínů, jako jsou tokoferoly, karoteny nebo askorbová kyselina. Z jedné třetiny je denní příjem tvořen fenolickými kyselinami a zbývající dvě třetiny připadají na flavonoidy (Scalbert a Williamson, 2000).

Příjem polyfenolů závisí na stravovacích návycích a osobních preferencích při výběru potravin. To se týká nejen celkového příjmu polyfenolů, různých tříd polyfenolů, ale i jednotlivých fenolických sloučenin (Hertog et al. 1993). Nejpřesnější výzkum ohledně denního příjmu polyfenolů byl proveden pro flavonoly, flavony (Hertog et al. 1992, a 1993) a isoflavony (Reinli a Block, 1996). Příjem flavonolů (jmenovitě kvercetinu) a flavonů v holandské populaci byl stanoven na 2 – 21 mg za den (Hertog et al. 1993). Pro Japonce činí denní příjem isoflavonoidů 30 - 40 mg

(Kimira et al. 1998, Wakai et al. 1999). Daná spotřeba v západních zemích je značně nižší kvůli omezené konzumaci sójových produktů (Kirk et al. 1999).

### **2.1.3 Aktivita rostlinných fenolických látek v metabolismu**

V biologických testech s tkáňovými kulturami bylo prokázáno, že fenoly nemají pouze aditivní, ale často synergistické účinky. Klinické studie, pokusy na zvířatech a testování s lidskými dobrovolníky tyto výsledky opakovaně prokazují (Bors a Michel, 2002). Často se projevují antioxidační aktivitou, která převyšuje celkovou antioxidační kapacitu vitamínu C a E a karotenoidů vyskytujících se v identické potravíně (Zloch, 2003).

V živých biologických systémech jsou oxidační pochody nezbytné pro získávání energie. Avšak příliš rychlá oxidace, nebo oxidace příliš velkého rozsahu je nežádoucí. Látky, které takové oxidační pochody v metabolismu zpomalují, se označují jako antioxidanty (Kalač, 2001). Obecně mají antioxidanty schopnost odbourávat volné radikály. Antioxidační vlastnosti polyfenolů se odvíjí od jejich redukčních chemických vlastností. Mohou se chovat jako donor elektronu nebo vodíkového protonu, reagovat s dalšími antioxidanty nebo mít potenciál k chelataci iontů přechodných kovů (zejména železa a mědi) (Rice-Evans, 1997). Antioxidační aktivita může být dále ovlivněna výsledným odvozeným radikálem, který má schopnost stabilizovat a delokalizovat nepárový elektron (Shahidi a Wanasunadra, 1992).

Dosud bylo izolováno a strukturně identifikováno přes 5000 přírodních látek s chemopreventivním účinkem a převážně fenolické a polyfenolické povahy (Zloch, 2003). V 80. letech 20. století byla v americkém Národním ústavu pro rakovinu byl zahájen výzkum zdravotního efektu rostlinných fenolů. V současnosti se při aplikaci těchto látek v prevenci i při terapii nádorových onemocnění se dosahuje příznivých výsledků (Marchland, 2002). Postupně bylo vybráno 40 sloučenin, které v pokusech na zvířatech úspěšně fungují jako blokátory iniciace nádorového procesu způsobeného chemickými látkami jako supresory buněčné proliferace a progresu nádorů a jako inhibitory endogenní tvorby karcinogenů. V nynější části výzkumu jsou tyto sloučeniny toxikologicky testovány. V dohledné době se předpokládá jejich uplatnění v biomedicínské praxi (Lee a Park, 2003). Nejslibnější výsledky byly získány se skupinou katechinů (obsaženy v čaji a ovoci), některých flavonolů (morin a naringenin z citrusů) a resveratrolů (z révových hroznů) (Kinghorn et al., 2003; Arai et al., 2002).

Polyfenoly vykazují i řadu dalších zdravotních benefitů. Zvyšují odolnost červených krvinek proti oxidativnímu stresu (Youdim et al., 2000), udržují normální cévní propustnost (Detre et al., 1986) a podílejí se na vasoprotektivních a protizánětlivých procesech organismu (Lietti et al., 1976). Působí tak proti vzniku krevních sraženin a snižují tak riziko infarktu myokardu nebo mozkové mrtvice. Ochranou lipoproteinů o nízké hustotě před oxidační modifikací brání časnému rozvoji aterosklerózy (Matějková, 2000).

## **2.2 Rozdělení rostlinných fenolických látek**

Rostlinné polyfenoly zastoupené ve stravě můžeme podle Fresca a kolektivu (2006) dělit následujícím způsobem:

- fenolické kyseliny a jejich analogy
- stilbeny
- flavonoidy a jejich analogy
- ostatní fenoly

Dalším způsobem klasifikace fenolických sloučenin je rozdělení na základě jejich uhlíkaté kostry na následující skupiny (Ioannou a Ghoul, 2012):

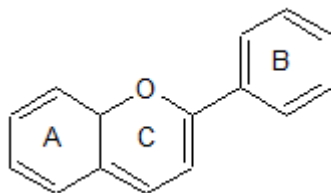
- fenolické kyseliny (C6-C1)
- fenylypropanoidy (C6-C3)
- polymery ligninu (C6-C3)<sub>n</sub>
- kumariny (cyklické C6-C3)
- flavonoidy (C6-C3-C6)

## **2.3 Charakteristika vybraných zástupců biologicky aktivních a fenolických látek**

### **2.3.1 Flavonoidy**

Flavonoidy, jsou značně rozsáhlou skupinou rostlinných fenolů. Vyjma chalconů, auronů a isoflavonů, sdílejí stejnou uhlíkovou kostru (viz Obr. 1). Struktura flavonoidů je tvořena dvěma benzenovými jádry (A a B) propojenými heterocyklem C tvořeným třemi atomy uhlíku a atomem kyslíku (Ioannou a Ghoul, 2012).

Přirozeně se flavonoidy vyskytují ve volné či vázané formě. Často jsou esterově vázané na jednu či dvě molekuly cukru přes O-glykosidickou vazbu (Fresco et al., 2006).

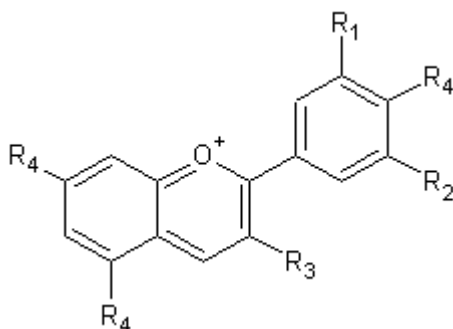


Obr. 1 Obecná struktura flavonoidů.

K flavonoidům řadíme následující skupiny sloučenin: flavonoly, flavony, isoflavony, flavanony, anthokyanidiny a favanoly. Všechny tyto skupiny vykazují významnou biologickou aktivitu v živých organismech.

#### 2.3.1.1 Anthokyaniny

Anthokyaniny jsou rozsáhlou podskupinou flavonoidů. Jedná se o glykosidy polyhydroxy a polymethoxy derivátů odvozených od 2-fenylbenzopyryliového kationtu, nebo flavylium solí (viz Obr. 2). Anthokyaniny jsou jinak také nazývány anthokyaniny. Rozdíly mezi jednotlivými anthokyaniny jsou dány různou mírou hydroxylace, vlastnostmi, množstvím a polohou připojených sacharidů či kyselin (Kong, 2003).



Obr. 2 Obecná struktura anthokyanů.

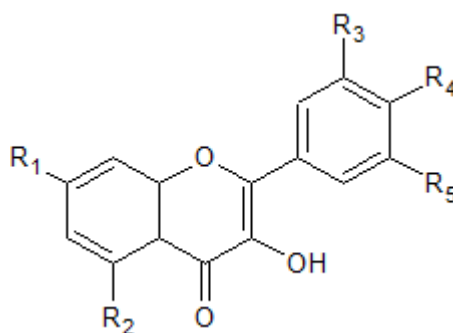
Anthokyaniny jsou velmi významná rostlinná barviva. Jejich barva je nejčastěji červená až modrá, a je dána typem přítomných anthokyanů, množstvím obsažených dalších pigmentů v materiálu a mění se působením vnějších podmínek (teplota, pH, přítomnost enzymů) (Velíšek, 2002b). Nejčastěji se u vyšších rostlin setkáme

s kyanidinem, pelargonidinem, peonidinem, malvidinem, petunidinem či delphinidinem (Kong, 2003).

Anthokyany v rostlinách zastávají mnoho funkcí. Podílejí se na pigmentaci rostlin a jejich plodů, působí jako antioxidanty, hmyzí repelenty a antibakteriální činidla. Zastávají také roli atraktantů pro zvířata zprostředkovávajících zoochorii či opylení (Kong, 2003).

### 2.3.2 Flavonoly

Flavonoly jsou další významnou skupinou flavonoidů s obecnou strukturou (viz Obr. 3). Nejvýznamnější flavonoly vyskytující se v potravinách jsou substituovány hydroxylovou skupinou v polohách R3, R4 a R5 a odlišují se substitucí v poloze R1 a R2 (Velíšek, 2002b).



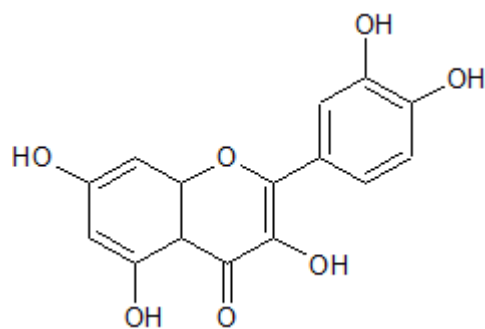
Obr. 3 Obecná struktura flavonolů.

Flavonoly se vyskytují zejména ve formě glykosidů. V rostlinách se často nachází jako kopigmenty, které doprovázejí anthokyany a mají nejčastěji žlutou barvu (Velíšek, 2002b). Mezi nejčastěji se vyskytující flavonolické aglykony řadíme kemferol, myricetin, kvercetin. Nejvíce se vyskytujícím glykosidem je rutin.

#### 2.3.2.1 Kvercetin

Kvercetin (3, 5, 7, 3', 4'-pentahydroxyflavon) se v rostlinách nachází v mnoha různých glykosidických formách (Kqhnau, 1976). Kupříkladu aglykon kvercetinu spojený s rutinosou, tvořící 3-O-glykosid, nazýváme rutin (Formica, 1995).





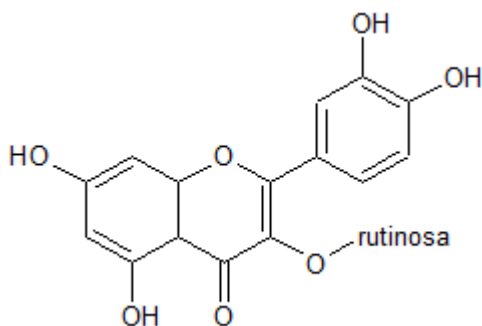
Obr. 4 Kvercetin.

Kvercetin (viz Obr. 4) se vyskytuje v různém ovoci a zelenině. Jmenovitě v černém rybízu, červeném víně, tmavé čokoládě, černém bezu, pomerančové šťávě, jablkách a cibuli, ve které se nachází v nejvyšší koncentraci. Kvercetin je nejběžnějším flavonolem ve stravě (Erlund, 2004; Ioannou, 2012).

Denní příjem kvercetinu byl stanoven na 3 až 38 mg ve Studii sedmi zemí (Hertog, 1995). Kvercetin zvyšuje odolnost organismu proti osteoporóze, plicním onemocněním, některým typům rakoviny a také proti procesům spojeným se stárnutím (Boots a kol., 2008). Má významný pozitivní vliv na nemoci spojené se srdcem, působí proti vysokému tlaku, srdeční arytmii, arteroskleróze, vyrovnává hladinu cholesterolu v krvi a také působí proti hepatotoxicky (Formica, 1995).

#### 2.3.2.2 *Rutin*

Rutin je flavonol odvozený od kvercetinu, přesněji se jedná o 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavon-3-rhamnoglukosid (Hosseinzadeh a Nassiri-Asl, 2014). Rutin je také známý pod názvem vitamín P (Khan, 2009).



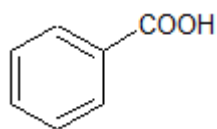
Obr. 5 Rutin.

Rutin (viz Obr. 5) se vyskytuje v mnoha jedlých rostlinách, například v černém čaji, pohance, mučence, jablkách (Hosseinzadeh a Nassiri-Asl, 2014).

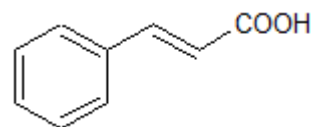
V metabolismu vykazuje rutin protizánětlivé, protialergenní, antioxidační, protivirové a protirakovinotvorné účinky (La Casa et al., 2006). Bývá užíván jako součást běžně dostupných terapeutik pro posílení žilní stěny (Český lékopis, 2009).

### 2.3.3 Fenolické kyseliny

Fenolické kyseliny dělíme do dvou hlavních skupin, a to fenolické kyseliny odvozené od kyseliny benzoové (obsahující sedm atomů uhlíku) a kyseliny odvozené od kyseliny skořicové (obsahující devět atomů uhlíku) (viz Obr. 6 a Obr. 7.). Tyto sloučeniny existují převážně hydroxylované formě, tudíž je zpravidla označujeme jako hydroxybenzoové a hydroxyskořicové kyseliny. Některé druhy přírodních fenolických kyselin se běžně vyskytují ve stravě. Zastoupeny jsou jak ve volné formě, tak ve vázané formě jako estery a amidy (Fiuza et al., 2004; Gomes et al., 2003).



Obr. 6 Benzoová kyselina.

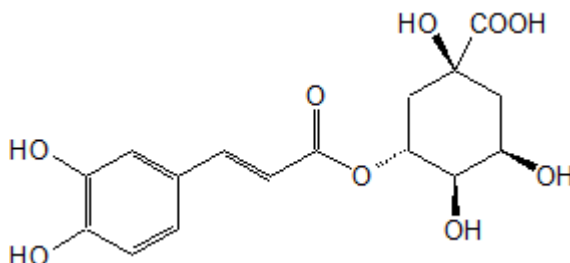


Obr. 7 Skořicová kyselina.

Deriváty kyseliny skořicové se v rostlinných materiálech vyskytují poměrně častěji než deriváty kyseliny benzoové. Fenolické kyseliny se v rostlinných materiálech nacházejí vázané na sacharidy či se estericky vážou s kyselinou chinovou, šikimovou a vinnou. Ve volné formě se fenolické kyseliny vyskytují jen zřídka (Ondrejovič, 2009).

### 2.3.3.1 Chlorogenová kyselina

Chlorogenová kyselina (5-O-kafeoylchinová kyselina) je nejběžnějším esterem kávové a chinové kyseliny. Řadíme ji k derivátům hydroxyskořicové kyseliny (Santana-Gálvez et al., 2017).



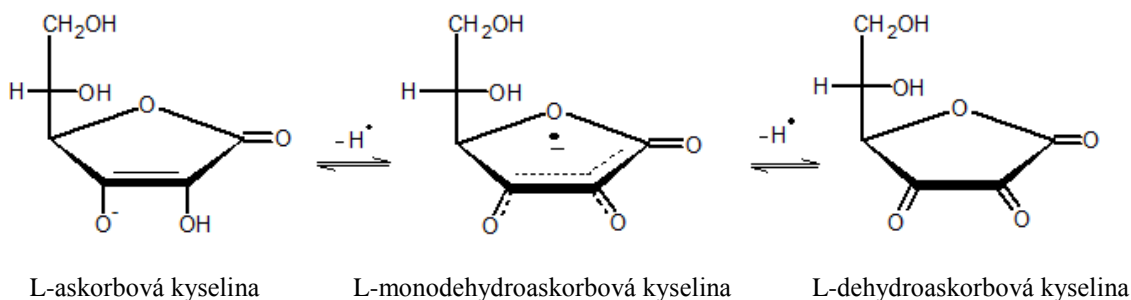
Obr. 8 Chlorogenová kyselina.

Chlorogenová kyselina (viz Obr. 8) je hlavní polyfenolickou sloučeninou v zrnkové kávě a syrových bramborách (Lachman, 2005). Dále je přítomna v různém ovoci a zelenině, jmenovitě v jablkách, artyčoku, mrkvi, hroznech, rajčatech, kiwi, švestkách, lilku a dalších (Santana-Gálvez et al., 2017).

V metabolismu má chlorogenová kyselina mnoho zdraví prospěšných vlastností. Působí zejména protizánětlivě, protirakovinotvorně a pozitivně ovlivňuje poruchy metabolismu lipidů a diabetes (Santana-Gálvez et al., 2017; Meng et al., 2013).

### 2.3.4 Vitamín C

Vitamín C neboli kyselina askorbová se vyskytuje ve čtyřech stereoizomerech (prostorových izomerech). Biologicky aktivní je však pouze L-askorbová kyselina ( $\gamma$ -lakton *L-threo*-hex-2-enové kyseliny). V organismu označujeme názvem vitamín C celý redoxní systém (viz Obr. 9), který zahrnuje L-askorbovou kyselinu, L-monodehydroaskorbovou kyselinu a L-dehydroaskorbovou kyselinu (Velíšek, 2002a).



Obr. 9 Formy vitamínu C v organismu (převzato z Chemie potravin)

Kyselina askorbová je významným ve vodě rozpustným vitamínem. Má významné redukční vlastnosti, které se podílejí na likvidaci volných radikálů a dalších aktivních forem kyslíku. Je považována za indikátor výživové kvality potravin po dobu jejího zpracování a skladování. V případě, že je v potravine zachován vysoký obsah askorbové kyseliny, je ztráta ostatních živin rovněž minimální. Pokles obsahu askorbové kyseliny závisí také na typu kultivaru (Koyuncu a Dilmaçunal, 2010).

#### 2.4 Drobné ovoce charakteristika a zastoupení

Jako drobné ovoce je označována skupina ovoce plodících rostlin s drobnými plody. Zpravidla se jedná o plody mající podobu malých bobulí, souplodí či plodenství. Jako drobné ovoce jsou nejčastěji označovány bobuloviny (Blažek a kol., 2001). Bobulovité ovoce náleží do několika čeledí. Za obvyklé zástupce bobulovitého ovoce jsou považovány čeleď *Rosaceae* (jahody, maliny, ostružiny), čeleď *Ericaceae* (borůvky, brusinky) a čeleď *Grossulariaceae* (černý a červený rybíz) (Skrovankova et al., 2015).

Mezi méně známé druhy drobného ovoce řadíme bezinky (*Sambucus* spp.), angrešt (*Ribes uva-crispa*), mochni peruánskou (*Physalis peruviana*), střemchu viržinskou (*Prunus virginiana*), ostružiník morušku (*Rubus chamaemorus*), šichu černou (*Empetrum nigrum*), zimolez modrý (*Lonicera caerulea* L.), muchovník olšolistý (*Amelanchier alnifolia*), jeřáb (*Sorbus* spp.), maqui (*Aristotelia chilensis*) a rakytník řešetlakový (*Hippophae rhamnoides*) (Skrovankova et al., 2015).

#### 2.5 Význam konzumace ovoce

Ovoce je důležitou součástí lidské stravy. Je významným zdrojem živin, vlákniny a fytochemikálií (Boeing, 2012). Dužnaté ovocné plody obsahují přibližně

79-87% vody. Z dalších látek jsou v ovoci nejvíce zastoupeny sacharidy, organické kyseliny, třísloviny, aromatické látky, dusíkaté látky, lipidy, vitamíny a minerální látky (Blažek et al, 2001). Drobné ovoce je nadto velmi chutné, nízkokalorické a je často konzumované v čerstvém stavu, což zajišťuje vysokou koncentraci a účinnost přítomných biologicky aktivních látek (Skrovankova et al., 2015).

Biologicky aktivní sloučeniny jsou v ovoci přítomny v ideální formě a jako takové jsou nenahraditelné syntetizovanými produkty (Blažek a kol., 2001). V drobném ovoci do skupiny biologicky aktivních látek řadíme antioxidanty, které zahrnují fenolické sloučeniny (fenolické kyseliny, flavonoidy) a rostlinná barviva (anthokyany a karotenoidy). Mezi dalšími antioxidanty v drobném ovoci jsou významné například vitamíny (vitamín C) a minerály s antioxidačními vlastnostmi (Skrovankova et al., 2015).

Konzumace ovoce zajišťuje přísun výše zmíněných látek a zvyšuje odolnost organismu proti onemocněním (Blažek et al., 2001). Podle doporučení Světové zdravotnické organizace by jejich průměrný denní příjem měl být zajištěn třemi porcemi zeleniny (přibližně 250 g) a dvěma porcemi ovoce (150 g). V České republice, podobně jako v celé polovině ostatních evropských států, je spotřeba ovoce a zeleniny hluboko pod touto doporučenou dávkou (v ČR méně než 200 kg/ osoba/ rok) (Zloch, 2003).

## **2.6 Bez černý (*Sambucus nigra* L.)**

Jedním z poměrně opomíjeného ovoce na území České republiky je bez černý (*Sambucus nigra* L.) patřící do čeledi pižmovkovité (*Adoxaceae*). Rod *Sambucus* čítá přibližně pětadvacet druhů bezu. V České republice je bez černý prakticky jediný přirozeně rozšířený zástupce s jedlými plody (Matějček et al., 2013).

Květy a plody bezu černého obsahují množství různých léčivých a zdraví velmi prospěšných látek. Přesto nejsou produkty z plodů bezu černého na českém trhu běžně dostupné a jsou více méně výsadou domácího zpracování. Zpravidla se ke zpracování sbírají plody z planě rostoucích keřů (Šišák, 2006).

### 2.6.1 Botanická charakteristika

Bez černý je keř či strom s hustě olistěnou korunou. Keř se dorůstá 1,5 až 5 m výšky, strom až 10 m výšky. Kmen je pokrytý světle hnědou až šedou vrásčitou borkou (kůrou) s čočinkami (lenticely). Větve jsou v mládí zelené a později postupně šednou, jsou lysé a tvarem hranaté. Dřeň větví je čistě bílá. Listy raší brzy, jsou vstřícné, lichozpeřené, vejčité, zašpičatělé, pětičetné s větším koncovým listem. Okraj listů je jemně pilovitý, jsou téměř přisedlé a na rubu jsou světlejší než na lici, kde jsou více zelené. Palisty jsou drobné a opadavé. Borka a listy po rozemnutí nepříjemně zapáchají. (Slavík et al., 2011; Bollinger, 1998)

Kvetení bezu černého probíhá v období května až července. Květy (viz Obr. 10) jsou malé, drobné, pětičetné bílé až nažloutlé barvy. Jsou silně vonné, uspořádané jsou v deštníkovitých vrcholičnatých latách s pěti hlavními paprsky. V průměru mají vrcholíky deset až dvacet centimetrů. Plody (viz Obr. 11) dozrávají v srpnu až září. Jedná se o lesklé černé kulaté peckovice o velikosti šest až osm milimetrů. Plody bezu jsou lidově nazývány bezinky. (Slavík et al., 2011; Bollinger, 1998)



**Obr. 10** Bez černý – květ.

Zdroj: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sambucus\\_nigra\\_4.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sambucus_nigra_4.jpg)



**Obr. 11** Bez černý – plod.

Zdroj: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sambucus\\_nigra-fruit001.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sambucus_nigra-fruit001.jpg)

Stanoviště typická pro bez černý jsou lesní okraje, nivní lesy, vlhké a smíšené lesy, křoviny, pastviny a rumišťe. Roste na půdách bohatých na dusík s humusovou vrstvou. Vyskytuje se až do výšek alpských údolí, tzn. 1600 metrů. Často se bez černý vyskytuje i v městské zástavbě, okolích zahrad na rumištích. Je používán jako součást parkové výsadby. Rozšiřován může být i semenožravými ptáky. (Slavík et al., 2011; Bollinger, 1998; Grau et al., 1996)

Bez černý je původním druhem v Evropě, Britských ostrovech a v oblasti kolem Černého moře. Není však rozšířen v jižním Španělsku, severním Skotsku, v severní Skandinávii a na Islandu (Atkinson a Atkinson, 2002).

### **2.6.2 Pěstování, kulturní odrůdy, plané odrůdy**

V evropských zemích s vyspělým ovocnářstvím je kulturní pěstování bezu černého poměrně rozšířenou záležitostí. Počátky intenzivní výstavby bezu černého se datují do sedmdesátých let 20. století (Mezey et al., 2006). Z hlediska pěstební náročnosti či nárokům na stanoviště je bez černý poměrně nenáročnou plodinou (Kráľ, 1998). Po ekonomické stránce můžeme bez černý rovněž zařadit k výhodným plodinám pro výsadbu. Oproti běžným komerčním ovocným druhům je velmi výhodné rychlé vegetativní množení (řízkováním klesají náklady), dlouhověkost dřeviny, bez nutnosti oplocování pěstebních ploch (proti okusu zvěří) a odolnost proti mrazu. U výsadeb v plné plodnosti jsou příznivé vysoké hektarové výnosy od 15 do 22 tun na hektar (Sansdrap, 2000). Krom ovocnářského využití bezu nabízí tato dřevina i jiné možnosti využití v jiných směrech jako je sklizeň květů či produkce lignifikované dendromasy (Matějček et al., 2013).

V ovocnářské praxi se pro výsadbu využívají kulturní odrůdy bezu černého. Tyto kulturní odrůdy však původně vznikaly záměrnou selekcí z planě rostoucích rostlin v přirozených přírodních podmínkách. Na základě těchto selekcí bylo uznáno několik desítek kulturních odrůd. Ty byly později zavedeny do ovocnářské praxe a intenzivního pěstitelství. Oproti planým odrůdám mají plody kulturních odrůd vyšší výnosovost plodů a nižší obsah potravinářsky nežádoucích alkaloidů (Matějček et al., 2013).

### **2.6.3 Obsahové látky v bezu černém**

Květy a plody bezu černého mají velmi vysoké obsahy biologicky aktivních látek (Matějček et al., 2013). Květy bezu černého obsahují organické kyseliny, glykosid rutin, alkaloid sambunigrin, silice, trísloviny, minerální látky a řadu flavonoidů.

Plody bezu (bezinky) obsahují organické kyseliny, glykosid rutin, sacharidy, minerální látky, aminokyseliny, karoteny, antokyany, alkaloidy (sambunigrin, sambucin) a vitamíny (B1, B2, C) (Dolejší et al., 1991; Kintlerová et al., 1993).

#### **2.6.4 Tradiční použití a kuchyňské úpravy**

Drobné ovoce se konzumuje nejen v čerstvé a mražené podobě, ale také v podobě zpracovaných výrobků, jako jsou sušené ovoce, ovocné konzervy, jogurty, nápoje a džemy (Shivraj a Se Won, 2014). Extrakty z bezu se rovněž používají jako přírodní ochucovadlo alkoholických i nealkoholických nápojů, ovocných kořalek a lihovin, šumivého vína a zmrzliny (Kaack et al. 2006).

Běžné manipulace s potravinami rostlinného původu, jako je chlazení a zmrazování, pasterace a kuchyňské úpravy pravděpodobně obsah biologicky aktivních forem těchto látek podstatně neovlivňují (Dragland et al., 2003). Domácí zpracování sezónního ovoce, jako jsou právě bezinky, je tedy běžnou a oblíbenou záležitostí. Dokladem je množství receptů na zpracování ovoce či záznamy z lidového léčitelství.

V tradičním lidovém léčitelství má bez nezastupitelnou úlohu. První záznamy o léčivém užití bezu černého v Evropě pocházejí již ze středověku. Bezové preparáty (čaje a odvary) se používaly k léčbě nachlazení, dýchacím onemocněním a otoků (Dadáková et al., 2011). Bez má močopudné a potopudné účinky a užíván je k léčbě vodnatosti (Macků a Krejča, 1987). Šťáva z bezinek je prostředkem proti bolestem, zvláště ischiasu, revmatismu a zánětu trojklanného nervu (Grau et al., 1996). V Čechách je květ (*Flos sambuci*) i plod (*Fructus sambuci*) evidován jako oficiální léčivý preparát, listy (*Folium sambuci*) se sbírají zřídka (Dadáková et al., 2011).

Krom léčivých účinků nabízí bez černý i široké kulinářské užití. Květy se konzumují osmažené v těstíčku, v podobě teplých polévek, kosmaticového octa, domácích limonád nebo čajových nálevů. Plody bezu - bezinky slouží k přípravě zavařenin (čistých či kombinovaných s dalšími druhy ovoce), marmelád, povidel, džemů, kompotů, rosolů, šťáv, sirupů, omáček, čajů, teplých či studených polévek, bezinkového vína a různých bezinkových likérů (Dostál a Opichal, 1991). Bezinky se konzumují zpravidla povařené, jelikož syrové bezinky mohou vyvolat nevolnosti



(bušení srdce, průjmy, plynatost) (Dostál a Opichal, 1991). Tyto nežádoucí účinky jsou způsobeny obsahem termolabilních glykosidů, které se varem rozkládají.

## **2.7 Analytické metody**

Fenolické sloučeniny jsou významné sekundární metabolity rostlin s příznivými biologickými účinky. Pro dostatečně citlivé a selektivní stanovení fenolických sloučenin v rostlinném materiálu se využívá hlavně kapalinová chromatografie (Ignat et al., 2011).

V rámci této diplomové práce proběhlo stanovení chlorogenové kyseliny, rutinu a kvercetinů metodou extrakce na pevné fázi (SPE) a následně kapalinovou chromatografií (HPLC). Antokyany byly stanoveny spektrofotometriky. V doplňkovém stanovení byl stanoven obsah askorbové kyseliny, rovněž metodou kapalinové chromatografie.

### **2.7.1 Extrakce na pevné fázi (SPE)**

Při stanovení složky ve směsi je často dané stanovení rušeno přítomností dalších složek ve směsi. Pro spolehlivé stanovení vybraných složek je nutné ze směsi odstranit rušící sloučeniny, nebo extrakcí oddělit vybranou stanovovanou složku (Křížek a Šíma, 2015).

Jednou z nejjednodušších přesto nejefektivnějších metod je extrakce na pevné fázi (SPE). Je často užívána k extrakci flavonoidů z vodných vzorků. Tato metoda je založena na selektivní extrakci molekul vybrané látky ze vzorku na pevném sorbentu v kolonce. Kolonky pro SPE jsou jednorázové, předpřipravené a finančně dostupné. Sorbentem je nejčastěji 18 uhlíkatý silikátový řetězec. Rozpouštědlo, respektive vodný roztok se vzorkem je obvykle okyselený, aby se zabránilo ionizaci flavonoidů, která by snižovala jejich retenci na sorbentu (Liu, 2008). Dávkování vzorku může probíhat manuálně. Zachycené látky na sorbentu mohou být následně promyty vhodným rozpouštědlem a dále analyzovány metodou HPLC.

### 2.7.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Jednou z nejvýznamnějších analytických separačních metod je chromatografie. Umožňuje oddělení a stanovení širokého množství organických látek. Principem chromatografické separace je nestejně rozdělení a retence složek aplikované směsi na koloně mezi dvěma fázemi (mobilní a stacionární fází) (Křížek a Šíma, 2015).

Metoda HPLC využívá kapalnou mobilní fázi. S ohledem na experimentální uspořádání probíhá vysokoúčinná kapalinová chromatografie v uzavřeném systému. Běžně se pracuje s tlaky od 1 do 60 MPa, přičemž jsou upřednostňována kontinuálně pracující pulzující čerpadla (Křížek a Šíma, 2015). Pro analýzu flavonoidů jsou nejčastěji používanými mobilními fázemi acetonitril a/nebo methanol v kombinaci s vodným roztokem acetátu nebo mravenčanového pufru (Liu, 2008). Dávkování vzorků probíhá perforací pryžového septa, mikrostřikačkou flow stop ventilem nebo šesticestným kohoutem s dávkovací smyčkou. Pro HPLC se užívají profesionálně plněné rovné kolony (Křížek a Šíma, 2015). Sorbentem (stacionární fází) pro analýzu flavonoidů jsou nejčastěji zrnka polymeru s 18 či 8 uhlíkatým řetězcem. Preferovaným způsobem detekce flavonoidů je v dnešní době UV-VIS spektrofotometr záření (Liu, 2008) nebo hmotnostní spektrometr. Detektor je zpravidla napojen na zařízení pro registraci průběhu analýzy-počítač se softwarem.

V poslední dekádě se začaly využívat kolony s velikostí zrna pod 2  $\mu\text{m}$ . Kolony těchto vlastností umožňují významné zkrácení doby analýzy při zachování vysoké rozlišovací schopnosti. Příkladem je vývoj a uplatnění metody pro současnou determinaci 15 flavonoidů v léčivé rostlině škornici (*Epimedium* spp.) na koloně s velikostí zrna 1.7  $\mu\text{m}$  (Cheng et al., 2008). Metoda HPLC byla také použita pro izolaci fenolických sloučenin z pohanky (Hung a Morita, 2008), rutinu a trans-veratrolu z vína a hroznů (Careri et al., 2003) a také antioxidační aktivitu fenolických sloučenin v černém a zeleném čaji (De Carvalho Rodrigues et al., 2015).

### 2.7.3 Spektrofotometrie UV/ VIS

Metody absorpční spektrofotometrie v oblasti UV/VIS jsou založeny na absorpci záření roztokem v rozmezí vlnových délek 190-800 nm. Látky, které absorbují určité vlnové délky, se jeví lidskému oku jako barevné (Křížek a Šíma,

2015). Anthokyany mají červené až modré zbarvení a jsou významnými rostlinnými barvivy (Velíšek, 2002b).

V přístrojích pro absorpční spektrofotometrii je monochromatické záření vytvářeno rozkladem bílého světla na monochromátoru (hranolu či mřížce). Roztok vzorku s vybraným analytem je ručně dávkován do kyvet, které jsou zároveň absorpčním prostředím. Kyvety a optika v přístroji jsou pro měření ve viditelné oblasti skleněné. Anthokyany, respektive kyanidin je měřen při 528 nm, tedy v oblasti viditelného záření. Při stanovování určitých analytů je podstatné určit vhodný standart. Vyhodnocování výsledků se provádí porovnáním hodnoty absorbance vzorku s absorbancí standartního roztoku. Dnešní moderní spektrofotometry umožňují po kalibraci standartními roztoky odečítat hodnoty koncentrace přímo (Křížek a Šíma, 2015). Pro svou jednoduchost a nízké náklady se ke stanovení celkových polyfenolů používají spektrofotometrické metody velmi často.

### **3 Cíle práce**

Drobné ovoce je oblíbenou sezónní potravinou, která zpestřuje běžný jídelníček. Nejčastěji je ovoce konzumováno v čerstvém stavu nebo se využívá jako surovina pro přípravu domácích ovocných konzerv (šťáva, sirup, marmeláda).

Díky obsahu biologicky aktivních sloučenin představuje bobulovité ovoce výživově cenný příspěvek k potravě. (Některé obsahové látky, zejména rostlinné polyfenoly, mají významné antioxidační účinky a přispívají k prevenci civilizačních chorob.)

Cílem této diplomové práce je zpracovat plody drobného ovoce (bezu černého) pěstovaného v České republice modelovými kuchyňskými úpravami. Ve zpracovaných vzorcích stanovit vybrané fenolické a biologicky aktivní látky. Stanovovány jsou chlorogenová kyselina, askorbová kyselina, celkový obsah antokyanů a rutin. Stanovení proběhlo metodou SPE, HPLC a spektrofotometricky opakovaně v rámci časového intervalu několika měsíců.

## **4 Materiál a metody**

### **4.1 Materiál**

Drobné ovoce je často využíváno jako výchozí surovina pro získání šťávy, která se může dále zpracovat na odvozené výrobky. Šťáva se získává lisováním ovoce nebo lisováním směsi ovoce s vodou. Získáme tak koncentrovanou či zředěnou šťávu v různém poměru. K druhému postupu se přistupuje v případě, že samotné ovoce je velmi aromatické nebo značně barevné. Lisováním bez přídavku vody by se nezískaly veškeré obsahové látky ovocného materiálu.

Šťáva z drobného ovoce se lisuje ihned po sklizni, nebo určité časové prodlevě. V případě, že se podrcené ovoce nechá před lisováním odležet, zajistíme tak navýšení výtěžku aromatických a barevných látek ve vylisované šťávě. Daný postup je zpravidla užívaný při zpracování modrých hroznů vinné révy. Dalším případným krokem při zpracování ovoce je okyselení ovocného materiálu před zpracováním. Nejčastěji se v potravinářství využívá citrónová kyselina.

Při návrhu experimentů pro tuto práci byly tyto postupy při zpracování ovoce zohledněny. Experimentálně byl ověřován vliv 1% (hmot.) okyselení citronovou kyselinou a jednodenního odležení ovocného materiálu před lisováním šťávy pro zjištění obsahu sledovaných sloučenin. Dále byl u výrobků ze šťávy sledován vliv pasterace a dlouhodobého skladování po dobu několika měsíců. Experimenty proběhly u dvou řad výrobků, u šťáv (50% obsah vody) a sirupů (50% sacharózy).

#### **4.1.1 Odběr vzorků bezu černého**

Odběr vzorků proběhl v lokalitě Lhenicko (49.0365689 N, 14.1072628 E) v září 2016. Zralé plody bezu černého o hmotnosti 3159 g byly sklizeny ručně. Z celkového sklizeného materiálu byly odděleny bobule o hmotnosti 2777 g, které byly dále zpracovány jako výchozí surovina pro všechny experimenty.

#### 4.1.1.1 Surovina pro získání šťávy

Výchozí surovinou byla směs bobulí a pitné vody v poměru 1:1. Směs byla po dobu 5 minut důkladně homogenizována ponorným mixérem. Poté byla homogenní směs rozdělena na čtyři části po 1300 g. Tyto čtyři části sloužily jako výchozí varianty materiálu, které byly označeny následujícím způsobem:

- **0-0:** surovina je bez okyselení, šťáva bude lisována ihned
- **0-K:** surovina je okyselena 1% citronovou kyselinou, šťáva bude lisována ihned
- **D-0:** surovina je bez okyselení, šťáva bude lisována po 24 hodinách
- **D-K:** surovina je okyselena 1% citronovou kyselinou, šťáva bude lisována po 24 hodinách

#### 4.1.1.2 Lisování šťávy

Výchozí homogenizovaný materiál byl lisován ihned nebo po uplynutí časové prodlevy 24 hodin přes silonovou tkaninu. Vylisovaná šťáva a odpad byly zváženy. Poté byla získaná šťáva použita pro přípravu dvou řad výrobků (šťáv a sirupů), které byly následně dlouhodobě skladovány po dobu několika měsíců. Oba typy výrobků obsahovaly stejné množství ovocné složky.

Byly zvoleny dva typy výrobků s následujícím značením:

- **J:** Džus – směs vylisované šťávy se stejnou hmotností vody
- **S:** Sirup – směs vylisované šťávy se stejnou hmotností sacharózy

V této fázi bylo pro zajištění dlouhodobější trvanlivosti přidáno 0,1 % (hmot.) sorbové kyseliny. Následně byly připravené výrobky rozděleny do nových, skleněných obalů opatřených víčkem a pasterovány po dobu 30 minut ve vroucí vodní lázni. Pasterované výrobky byly dlouhodobě skladovány v chladu při 6 °C a temnu (lednice).

Obsah sledovaných látek byl stanoven po každém významném kroku přípravy: získání šťávy, míchání s vodou či sacharózou, po pasteraci a při skladování každé tři měsíce ve všech připravených vzorcích.

## **4.2 Chemikálie a přístroje**

### **4.2.1 Chemikálie**

redestilovaná voda (Premier, USA)

$\alpha$ -naftyloctová kyselina (Lachema, ČR)

L-askorbová kyselina (Merck, Německo)

Chlorovodíková kyselina (Lachema, ČR)

methanol (LiChrosolv Reag. Ph. Eur, Merck)

acetonitril (LiChrosolv Reag. Ph. Eur, Merck)

šťavelová kyselina (Penta, ČR)

sorbová kyselina (Penta, ČR)

EDTA (LachNer, ČR)

mravenčí kyselina (Penta, ČR)

kyanin-chlorid (Sigma-Aldrich, Německo)

sacharóza (Cukr krystal Korunní)

pitná voda

### **4.2.2 Přístroje a pomůcky**

Sada laboratorního skla: (Fisher Scientific, Pardubice, ČR)

Skleněné filtrační zařízení (Sigma Aldrich)

Zkumavky s víčkem s teflonovým těsněním

Analytické váhy AB 204 (Mettler Toledo, Švýcarsko)

Technické váhy Kern (Německo)

Pipety automatické, objem 20-200  $\mu\text{l}$  a 100-1000  $\mu\text{l}$  Transferpette (Treff AG, Švýcarsko)

Kombinovaná lednička s chladničkou (Bosch Cooler, Německo)

Teplovzdušná sušárna ULM (Memmert, Německo)

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

Magnetické míchadlo (Heidolph, Německo)

SPE kolonky RP-18 (Merck, Německo)

Dávkovač kapalin 5 ml (Sklo Union, ČR)

SPE izolační jednotka (vývojové dílny JU, ČR)

Filtry ze skleněných vláken GF/C (Whatman, Velká Británie)

Filtrační papír Filtrak (Filtrak GmbH, Německo)

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

Kolona Zorbax SB-C8 (4,6 x 150 mm, zrnitost částic stacionární fáze 5  $\mu\text{m}$ ) (Agilent Technologies, USA)

Kolona Zorbax SB-C18 (4,6 x 50 mm, zrnitost částic stacionární fáze 1,8  $\mu\text{m}$ ) (Agilent Technologies, USA)

Biochrom WPA Lightwave II spektrofotometr (WPA Biochrom, UK)

Skleněné tyčinky

Silonová tkanina a sítko

Nerezové ocelové hrnce



Vařečky

Nálevky

Sada zavařovacích sklenic s víčky

Varná indukční deska Petriho misky

Lžičky

### **4.3 Metody**

#### **4.3.1 Stanovení obsahu celkových anthokyanů**

Zvolený postup pro stanovení anthokyanových barviv vychází z již publikované metodiky v diplomové práci Matějková 2011 (DP VUT v Brně). Zbarvení bezinek je způsobeno polyfenolickými barvivy – anthokyany. Nejvíce zastoupeným barvivem je kyanin. Při stanovení se barviva oddělí pomocí extrakce do extrakčního činidla, kterým je roztok okyseleného methanolu 0,1% kyselinou chlorovodíkovou. Vzorek se následně zfiltruje a neprodleně se měří absorbance při vlnové délce 528 nm.

Do odměrné baňky o objemu 50 ml byl navážen 1 g homogenního materiálu, baňka se doplnila extrakčním činidlem a obsah se důkladně promíchal. Před měřením byl vzorek přefiltrován přes filtr ze skleněných vláken (Z7). Přefiltrované vzorky byly neprodleně měřeny na UV/VIS spektrofotometru. Vzorky byly měřeny proti čistému extrakčnímu činidlu při vlnové délce 528 nm. Pro vytvoření kalibrační řady v pracovním rozsahu 0,5 – 1000 mg/kg čerstvé hmoty, byly za stejných podmínek naměřeny standardy kyanin-chloridu. Obsah celkových anthokyanů byl vyjádřen jako obsah kyanin-chloridu v mg/ kg výrobku.

#### **4.3.2 Stanovení obsahu vitamínu C.**

Pro stanovení obsahu vitamínu C je zjišťován obsah L-askorbové kyseliny a jí příbuzných látek (pravděpodobně L-dehydroaskorbová kyselina). Po extrakci materiálu extrakčním činidlem proběhne stanovení vitamínu C chromatograficky pomocí metody HPLC. L-askorbová kyselina má při zpracování vzorku tendenci rychle oxidovat. Aby se této nežádoucí oxidaci zabránilo, byl jako extrakční činidlo

použit roztok obsahující šťavelovou kyselinu a chelatační činidlo (0,02 mol/l šťavelové kyseliny a 0,5 mmol/l EDTA).

Do odměrné baňky o objemu 100 ml byl navážen kapalný materiál o hmotnosti 2,5 g. Odměrná baňka se doplnila extrakčním činidlem a obsah se důkladně promíchal. Před chromatografickou separací byl vzorek filtrován přes filtr ze skleněných vláken (Z7). Vzorky byly měřeny bezprostředně po ukončení přípravy.

Postup pro chromatografické stanovení vitamínu C vychází z publikované práce ABIDA BEGUM and S. HARIKRISHNA (2010) a podmínky pro chromatografickou separaci byly sestaveny na pracovišti katedry aplikované chemie ZF.

Chromatografická separace byla provedena na přístroji UHPLC Agilent 1200 Series Rapid Resolution LC System na koloně Zorbax SB-C8 (4,6 x 150 mm, zrnitost 5  $\mu$ m). Mobilní fází byl 0,02 M roztok šťavelové kyseliny. Objem nastříkovaného vzorku byl 5  $\mu$ l a teplota při analýze byla 25°C. Absorbance vzorku byla odečítána při vlnové délce 254 nm. Zvolené podmínky umožnily koeluci všech forem vitamínu C. Kvantifikace byla provedena s použitím standardu L-askorbové kyseliny v pracovním rozsahu 5-100 mg/kg čerstvého materiálu.

#### **4.3.3 Stanovení obsahu rutinu, kvercetinu a chlorogenové kyseliny.**

Na základě předchozích studií (Dadáková a kol., 2011) je zřejmé, že v ovocné surovině z bezu černého jsou převažujícími látkami flavonoid rutin a chlorogenová kyselina jako nejvíce zastoupená fenolická kyselina. U materiálů bohatých na flavonoidní glykosidy se může při tepelném zpracování uvolňovat volný kvercetin. Všechny jmenované látky byly v rámci této práce stanoveny ve všech ovocných materiálech.

Vybraný postup chromatografického stanovení je založen na publikované práci (Dadáková a Kalinová, 2010) a upraven pro současnou analýzu chlorogenové kyseliny.

Byl navážen 1 g vzorku šťávy nebo sirupu a naředil se v 500 ml kádince vodou na 200 ml a byl přidán antioxidant - 80 mg askorbové kyseliny. Hodnota pH vzniklého

roztoku byla upravena s použitím pH-metru na hodnotu 3. Poté byl roztok zfiltrován přes filtr ze skleněných vláken na vakuové filtrační aparatuře. K promývání ulpělých zbytků analytů na filtru bylo použito 25 ml methanolu. Následně byl filtrát převeden kvantitativně do 500 ml odměrné baňky a doplněn destilovanou vodou po rysku.

Pro extrakci na pevné fázi (SPE) byly použity kombinované kolonky OASIS, které jsou schopny zachycovat polární i nepolární sloučeniny současně. Kolonky byly nejprve kondicionovány promytím 10 ml methanolu, poté promytím 10 ml 5% roztoku methanolu. K izolaci sledovaných sloučenin extrakční metodou (SPE) byl použit celý objem připraveného roztoku. Po skončení aplikace vzorku byla kolonka OASIS sušena procházejícím vzduchem po dobu 20 minut.

Zachycené látky na kolonce byly vymyty s použitím 1,4 ml methanolu. K takto získanému vzorku bylo přidáno 200 µg  $\alpha$ -naftyloctové kyseliny v methanolickém roztoku jako vnitřní standard.

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

Při chromatografickém stanovení byly použity dva roztoky jako mobilní fáze. První roztok byl A: 5% acetonitril, 0,1% mravenčí kyselina ve vodě a druhý roztok B: 0,1% mravenčí kyselina v acetonitrilu. Byl použit lineární gradient z 0 na 100% složky B během 15 minut. Nastříkovalo se 5 µl vzorku, teplota při analýze byla 25 °C. Absorbance vzorku byla odečítána při vlnových délkách 270 nm pro rutin, kvercetin a vnitřní standard a při 330 nm pro chlorogenovou kyselinu. Jako analytická odezva byl použit poměr ploch pod píkem analytu a vnitřního standardu. Kvantifikace byla provedena prostřednictvím standardu rutinu v rozsahu 10-500 mg/kg a pro chlorogenovou kyselinu a kvercetin v pracovním rozsahu 5-100 mg/kg čerstvého materiálu. Mez stanovitelnosti byla pro kvercetin a chlorogenovou kyselinu 5 mg/kg a pro rutin 10 mg/kg materiálu.

## 5 Výsledky a diskuze

Sklizené plody bezu černého byly zpracovány běžnými kuchyňskými úpravami na dva finální typy výrobků - sirupy a šťávy. Způsob zpracování výchozí suroviny je popsán v kapitole 4.1.1.1 a 4.1.1.2. Obsah sledovaných analytů byl stanoven po každém důležitém kroku přípravy. Následně byly sledovány změny obsahu vybraných biologicky aktivních látek při dlouhodobém skladování po 3 měsíčních intervalech. Pro přehlednost je shrnuto označení a způsob úpravy dílčích výrobků do tabulky č. 1.

*Tabulka č. 1 Označení vzorků a jejich způsob úpravy*

označení	typ	způsob úpravy
B	výchozí surovina	čisté bobule
0-0		ihned lisovaná šťáva, bez okyselení
0-K		ihned lisovaná šťáva, okyselená 1% citronovou kyselinou
D-0		šťáva lisovaná po 24 hodinách, bez okyselení
D-K		šťáva lisovaná po 24 hodinách, okyselená 1% citronovou kyselinou
0-0-J	šťáva	směs ihned lisované šťávy s vodou 1:1
0-K-J		směs ihned lisované a okyselené šťávy s vodou 1:1
D-0-J		směs odležené lisované šťávy s vodou 1:1
D-K-J		směs odležené lisované a okyselené šťávy s vodou 1:1
0-0-S	sirup	směs ihned lisované šťávy se sacharózou 1:1
0-K-S		směs ihned lisované a okyselené šťávy se sacharózou 1:1
D-0-S		směs odležené lisované šťávy se sacharózou 1:1
D-K-S		směs odležené lisované a okyselené šťávy se sacharózou 1:1

## 5.1 Stanovení obsahu celkových anthokyanů

Stanovení celkového obsahu anthokyanů proběhlo spektrofotometriky na přístroji Biochrom WPA Lightwave II při 528 nm. Vzorby byly stanovovány oproti standartu kyanin-chloridu. Analýza proběhla nejdříve pro výchozí suroviny.

*Tabulka č. 2 Naměřený obsah celkových anthokyanů ve výchozích surovinách a bobulích*

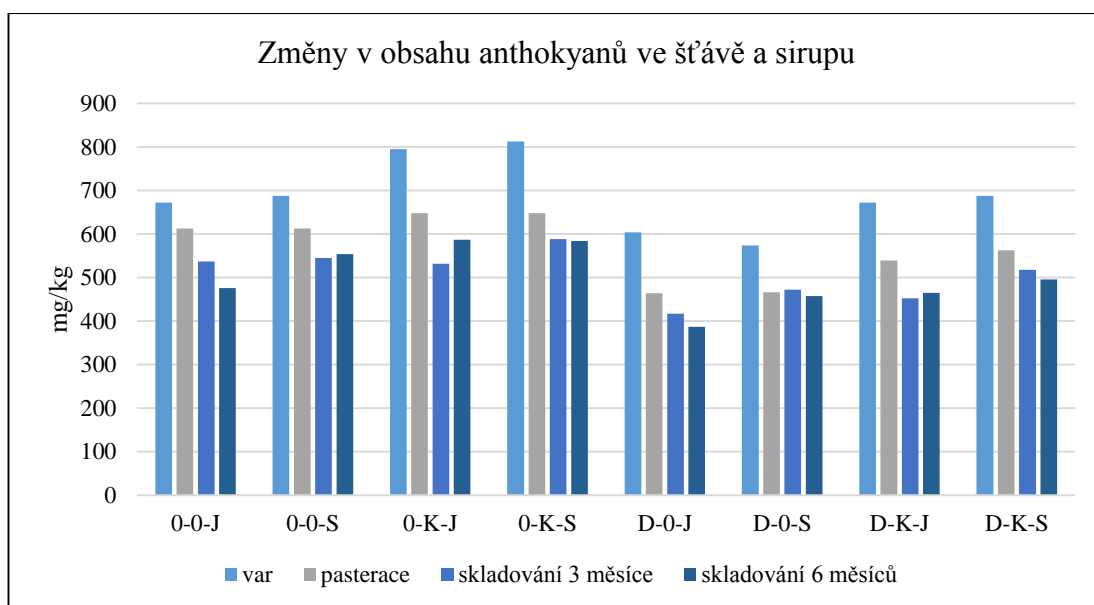
typ suroviny	bobule B	surovina 0-0	surovina 0-K	surovina D-0	surovina D-K
celkové anthokyany (mg/kg) ± SD	2790 ± 51	1320 ± 12	1410 ± 6,6	1210 ± 10	1300 ± 24

Nejvyšší množství anthokyanů obsahoval základ z bobulí (viz Tab. č. 2). Následně proběhlo stanovení anthokyanů po tepelných úpravách a dlouhodobém skladování v intervalu 3 a 6 měsíců. Každý vzorek byl analyzován třikrát ve dvou opakováních. Výrobky byly skladovány v chladu a temnu.

*Tabulka č. 3 Naměřený obsah celkových anthokyanů ve šťávě a sirupu po úpravách a dlouhodobém skladování*

obsah celkových anthokyanů (mg/kg)				
výrobek	var ± SD	pasterizace ± SD	po 3 měsících skladování ± SD	po 6 měsících skladování ± SD
0-0-J	672 ± 17	613 ± 13	537 ± 28	475 ± 6,7
0-0-S	687 ± 11	613 ± 12	545 ± 34	553 ± 7,3
0-K-J	795 ± 12	648 ± 21	532 ± 92	587 ± 16
0-K-S	812 ± 12	648 ± 49	588 ± 49	584 ± 10
D-0-J	604 ± 14	464 ± 13	417 ± 16	387 ± 16
D-0-S	573 ± 31	466 ± 35	472 ± 30	457 ± 12
D-K-J	672 ± 17	539 ± 4,0	452 ± 12	465 ± 7,1
D-K-S	687 ± 11	563 ± 13	517 ± 2,5	496 ± 34

Každý vzorek byl analyzován třikrát ve dvou opakováních, výsledné hodnoty jsou průměrnými hodnotami tří paralelních stanovení. Pro přehled o úbytku či nárůstu celkového obsahu anthokyanů byl sestrojen graf (viz Obr. 12). Celkový obsah anthokyanů se po tepelných úpravách s prodlužující dobou skladování snižoval. Tento trend se s drobnými výchyly uplatnil u všech typů výrobků. U výrobků 0-0-S (směs ihned lisované šťávy se sacharózou 1:1), 0-K-J (směs ihned lisované a okyselené šťávy s vodou 1:1) a D-K-J (směs odležené lisované a okyselené šťávy se sacharózou 1:1) byl v 6 měsíci skladování zaznamenán zvýšený obsah celkových anthokyanů.



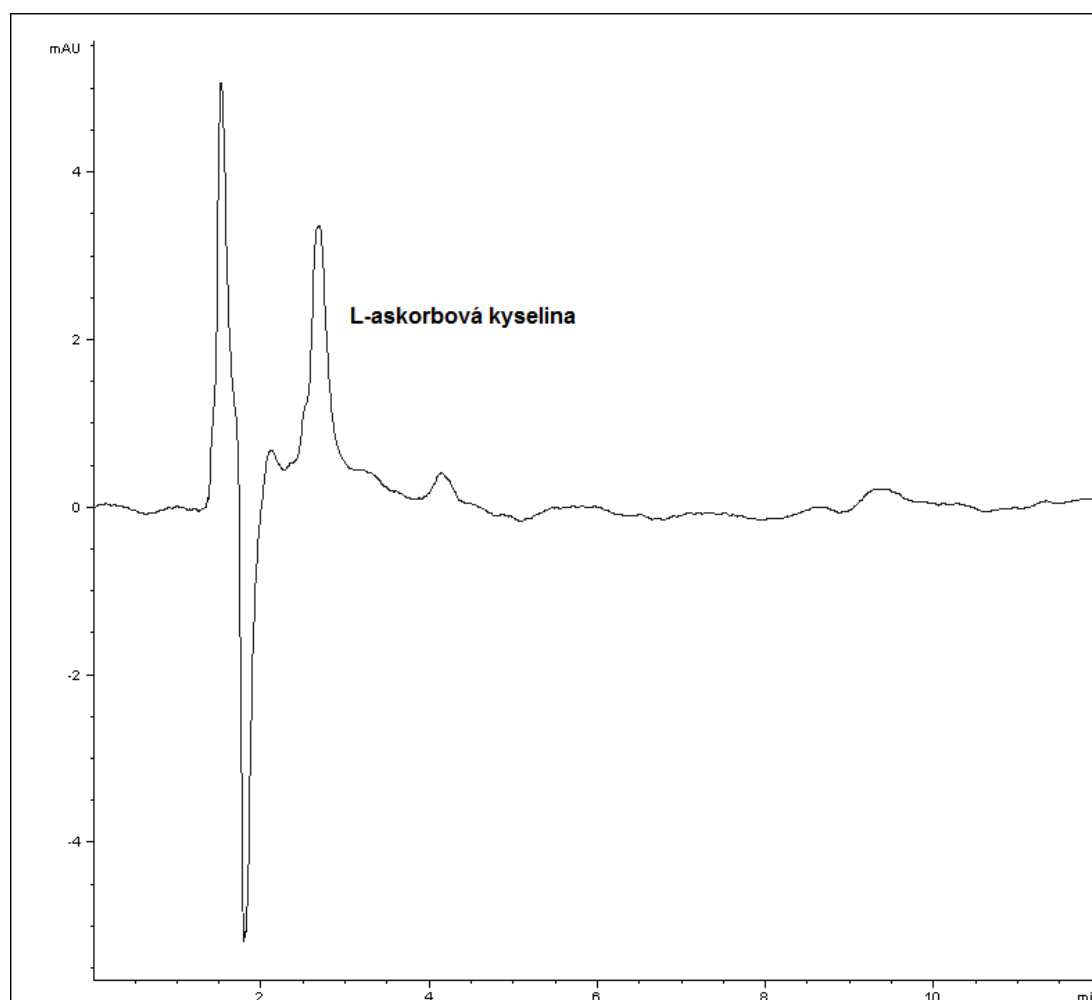
**Obr. 12** Změny obsahu anthokyanů ve výrobcích z bezinek

Navýšení obsahu anthokyanů mohl způsobit vznik barevných oligomerů z původních anthokyanových barviv v důsledku dlouhodobého skladování. V bezinkách se nacházejí fenolické kyseliny, což u těchto konkrétních vzorků potvrzuje stanovení chlorogenové kyseliny (viz kap. 5.5). Anthokyaniny a fenolické kyseliny se mohou chovat jako kopigmenty. V již publikované práci (Eiro a Heinonen, 2002) byly barevné kopigmenty prokazatelně stanoveny a studovány rovněž z hlediska dlouhodobého skladování po dobu 6 měsíců.

Pro zachování vyššího obsahu anthokyanů se jeví okyselení výrobků a okamžité lisování suroviny jako vhodné opatření pro šťávy i sirupy.

## 5.2 Stanovení obsahu vitamínu C.

Obsah vitamínu C byl sledován ve výchozích surovinách a výrobcích z bezinek metodou HPLC. Jako vitamín C byl stanovován obsah L-askorbové kyseliny. Na chromatografickém záznamu (viz Obr. 13), je viditelný zřetelný pík reprezentující L-askorbovou kyselinu.



*Obr. 13 Chromatografický profil bezinek*

Neměřené hodnoty vitamínu C v bezinkách a výchozích surovinách jsou shrnuty v tabulce č. 4. Nejvíce vitamínu C bylo obsaženo v čerstvém ovocném základu z bobulí.

*Tabulka č. 4 Naměřený obsah vitamínu C ve výchozích surovinách a bobulích*

typ suroviny	bobule B	surovina 0-0	surovina 0-K	surovina D-0	surovina D-K
vitamín C (mg/kg) ± SD	175 ± 8,1	55,8 ± 0,79	63,2 ± 1,7	25,0 ± 0,50	64,1 ± 0,40

Následně byl obsah vitamínu C stanovován u výrobků z bezinek. Stanovení proběhlo pro výrobky, které prošly tepelnou úpravou a pro výrobky, které byly dlouhodobě skladovány po 3 a 6 měsících. Každý vzorek byl analyzován dvakrát ve dvou opakováních. Výsledné hodnoty uvedené v tabulce (viz Tab. 5) jsou průměrnými hodnotami dvou paralelních stanovení.

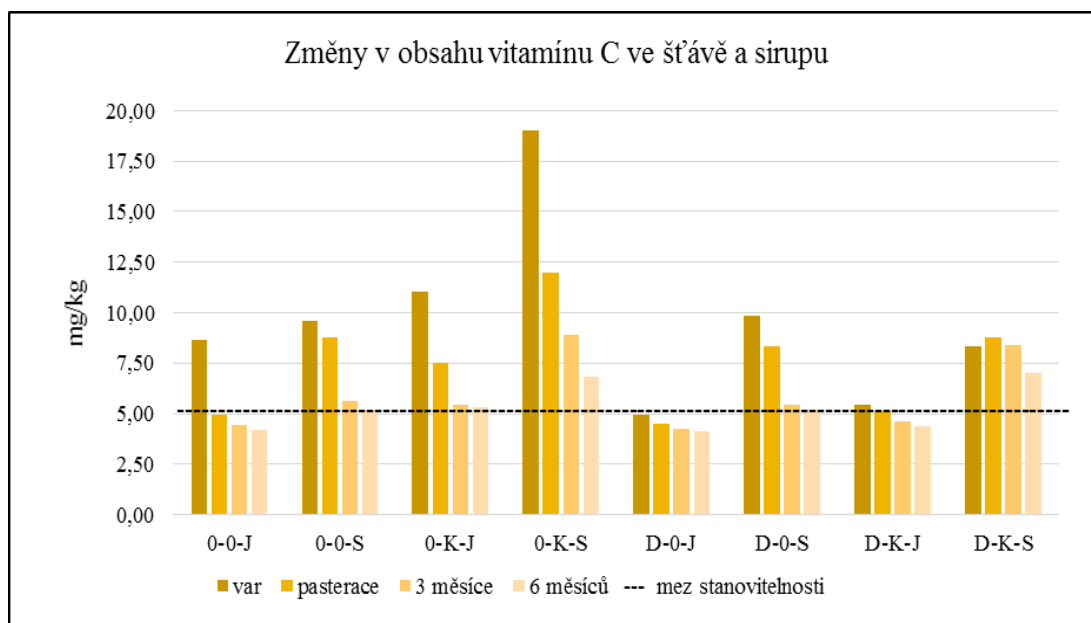
*Tabulka č. 5 Naměřený obsah vitamínu C ve šťávě a sirupu po úpravách a dlouhodobém skladování*

obsah vitamínu C (mg/kg)				
výrobek	var ±SD	pasterizace ± SD	po 3 měsících skladování ± SD	po 6 měsících skladování ± SD
<b>0-0-J</b>	8,67 ± 0,87	< LOQ	< LOQ	< LOQ
<b>0-0-S</b>	9,60 ± 1,8	8,76 ± 2,4	5,66 ± 0,62	5,18 ± 1,1
<b>0-K-J</b>	11,0 ± 1,1	7,53 ± 1,7	5,44 ± 0,43	5,32 ± 0,41
<b>0-K-S</b>	19,0 ± 1,3	12,0 ± 3,5	8,93 ± 0,49	6,80 ± 0,98
<b>D-0-J</b>	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
<b>D-0-S</b>	9,83 ± 0,79	8,34 ± 0,53	5,47 ± 1,5	5,17 ± 1,2
<b>D-K-J</b>	5,43 ± 0,53	5,15 ± 0,68	< LOQ	< LOQ
<b>D-K-S</b>	8,32 ± 0,39	8,77 ± 1,2	8,42 ± 0,38	7,01 ± 0,82

Naměřené hodnoty vitamínu C menší než 5 mg/kg jsou v tabulce č. 5 označeny jako < LOQ. Z grafu je patrný trend postupného úbytku vitamínu C. Nejvyšší zjištěné hodnoty obsahu vitamínu C byly stanoveny pro výrobek 0-K-S (směs ihned lisované a okyselené šťávy se sacharózou 1:1). Naopak u výrobku D-0-J (směs odležené lisované šťávy s vodou 1:1) byly všechny naměřené hodnoty vitamínu C pod mezí stanovitelnosti.



Z hlediska dlouhodobého skladování klesl obsah vitamínu C pod 5 mg/kg u tří výrobků 0-0-J (směs ihned lisované šťávy s vodou 1:1), D-0-J (směs odležené lisované šťávy s vodou 1:1) a D-K-J (směs odležené lisované a okyselené šťávy s vodou 1:1).

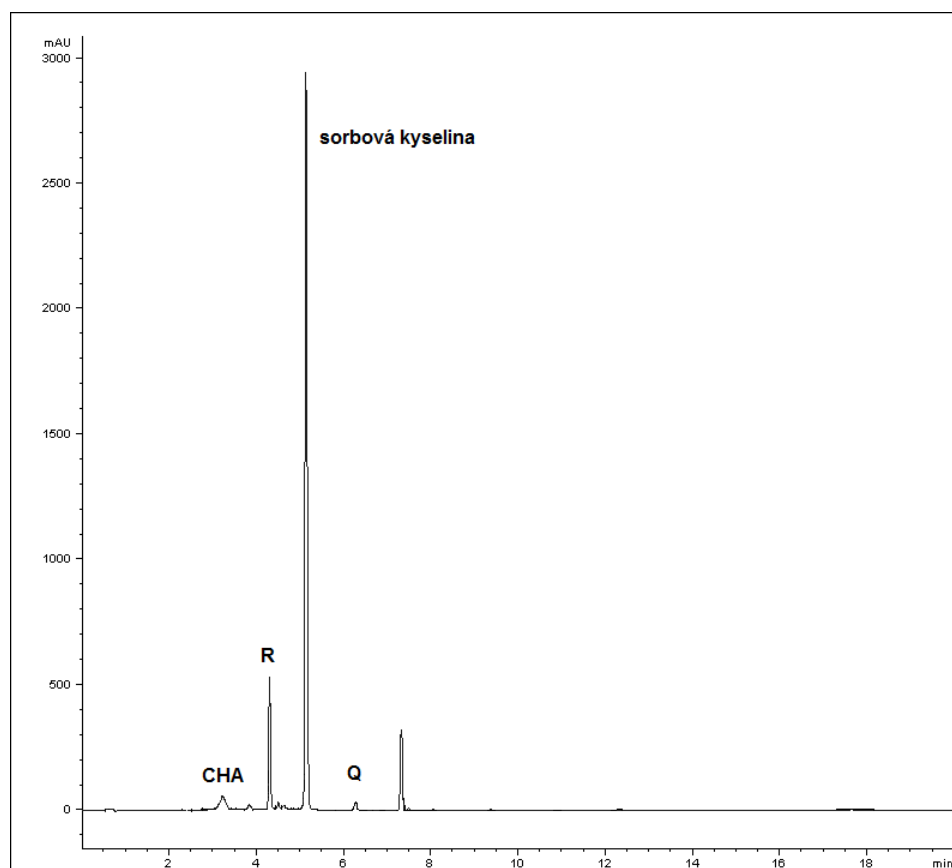


**Obr. 14** Změny obsahu vitamínu C ve výrobcích z bezinek

Vitamín C je jedním z nejméně stabilních vitamínů, který velmi ochotně reaguje s volnými radikály (Velíšek, 2002a). Nejvíce vitamínu C obsahuje čerstvé ovoce – v našem případě bezinky. Úbytek vitamínu C u produktů s prodlužujícími se tepelnými úpravami a skladováním, je tedy předpokládaným jevem. V kyselém prostředí je vitamín C stabilnější (Velíšek, 2002a), také přidavek sacharózy působí pozitivně (snížení vodní aktivity).

### 5.3 Sledované fenolické látky

Chromatografický profil sirupu z bezinek ukazuje zastoupení všech vybraných analytů – chlorogenové kyseliny, rutinu a kvercetin. Nejvyšší pík vykazuje sorbová kyselina, tedy aditivum sloužící k prodloužení trvanlivosti výrobků.



**Obr. 18** Chromatografický profil bezinkového sirupu

Nejvíce zastoupeným analytem ve vzorcích stanoveným metodou HPLC je flavonol rutin (viz označení R na Obr. 18). Následuje chlorogenová kyselina (CHA) a flavonol kvercetin (Q).

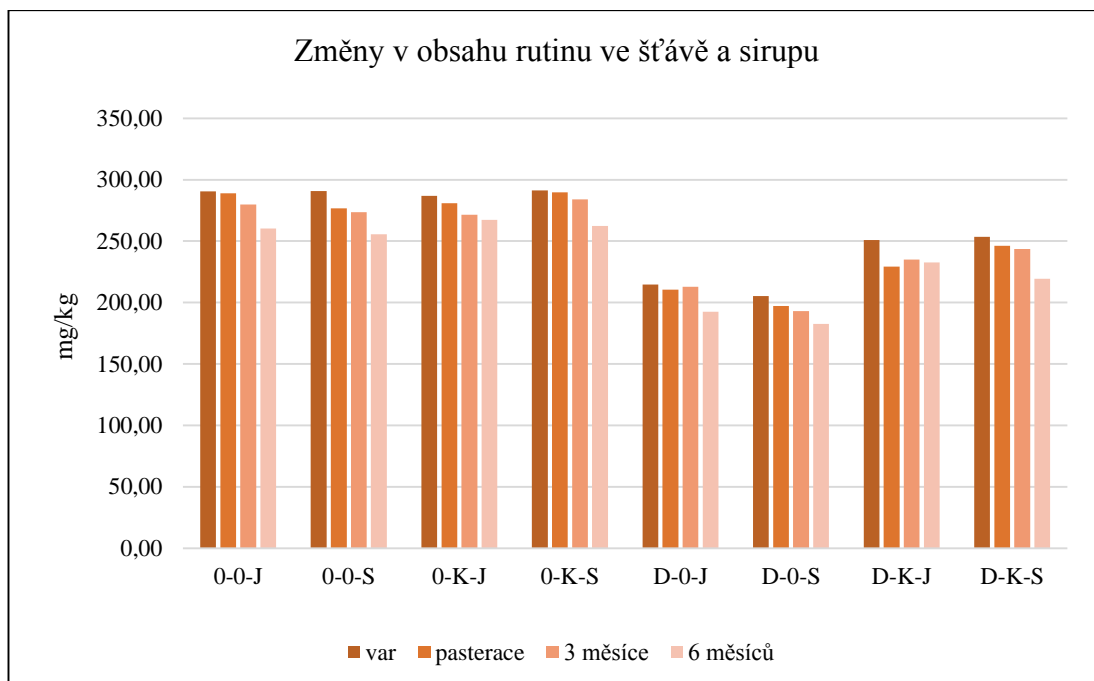
#### 5.4 Stanovení obsahu rutinu.

Stanovení obsahu rutinu u výrobků z plodů bezu černého proběhlo chromatografickou metodou HPLC. Obsah rutinu byl zjišťován u výrobků z bezinek po tepelných úpravách a dlouhodobém skladování. Uvedené hodnoty jsou průměrnými hodnotami dvou paralelních stanovení, ve kterých byl vzorek analyzován dvakrát.

*Tabulka č. 6 Naměřený obsah rutinu ve šťávě a sirupu po tepelných úpravách a dlouhodobém skladování*

obsah rutinu (mg/kg)				
výrobek	var ± SD	pasterizace ± SD	po 3 měsících skladování ± SD	po 6 měsících skladování ± SD
<b>0-0-J</b>	291 ± 9,9	289 ± 6,7	280 ± 3,4	260 ± 3,3
<b>0-0-S</b>	291 ± 3,8	277 ± 1,0	274 ± 3,5	256 ± 11
<b>0-K-J</b>	287 ± 0,5	281 ± 5,8	272 ± 2,9	267 ± 5,0
<b>0-K-S</b>	291 ± 5,5	290 ± 2,5	284 ± 5,6	262 ± 13
<b>D-0-J</b>	215 ± 7,8	211 ± 4,7	213 ± 4,9	193 ± 4,0
<b>D-0-S</b>	205 ± 4,9	197 ± 2,1	193 ± 0,0	183 ± 1,0
<b>D-K-J</b>	251 ± 5,2	229 ± 1,5	235 ± 4,6	233 ± 5,9
<b>D-K-S</b>	254 ± 5,9	246 ± 4,4	245 ± 9,1	220 ± 11

Z grafického znázornění na Obr. 14 je patrné, že u dvou variant výrobků D-0- J a D-0-S (směs odležené lisované šťávy s vodou 1:1 a směs odležené lisované šťávy se sacharózou 1:1) byly naměřeny nejnižší hodnoty rutinu ze všech stanovení. Menší obsah rutinu ve všech fázích úprav a skladování také vykazovaly výrobky D-K-J a D- K-S (směs odležené lisované a okyselené šťávy s vodou a směs odležené lisované a okyselené šťávy se sacharózou 1:1).



**Obr. 15** Změny obsahu rutinu ve výrobcích z bezinek

Na snížený obsah rutinu ve šťávách a sirupech s označením D mělo nejspíše vliv jednodenní odležení před lisováním. Glykosid rutin pravděpodobně během dané doby podléhal enzymové hydrolýze. Okyselení u den odleželých výrobků (D- K-J a D-K-S) dle naměřených dat umožnilo zachování vyšší hladiny rutinu.

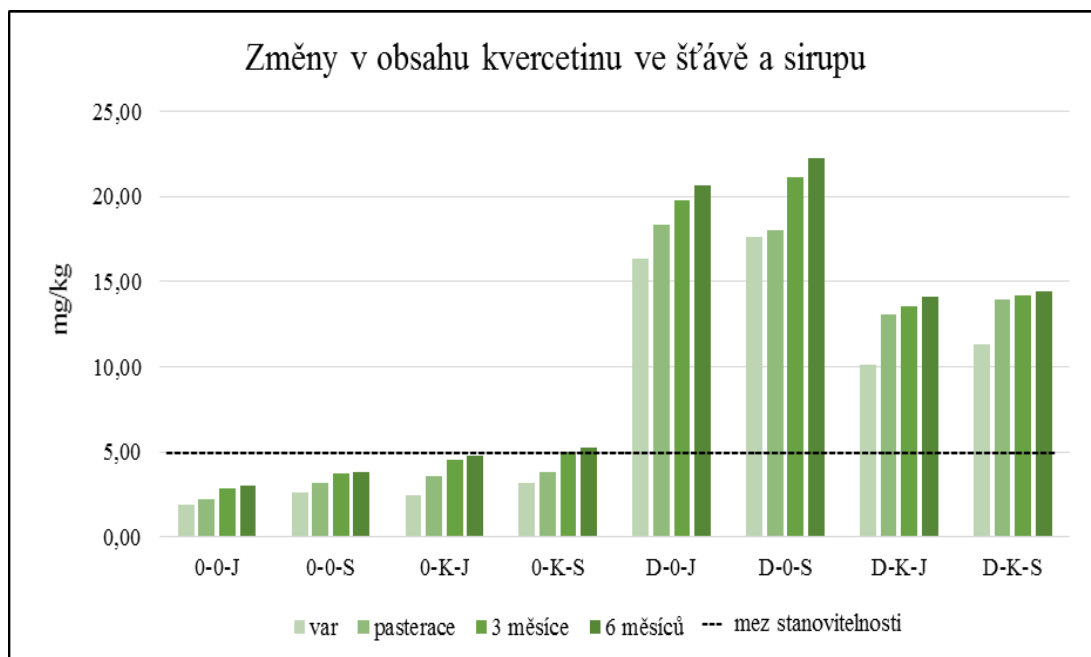
## 5.5 Stanovení obsahu kvercetinu.

Obsah kvercetinu byl stanovován u výrobků z bezinek metodou HPLC. Stanovení proběhlo pro výrobky, které prošly tepelnou úpravou a pro výrobky, které byly dlouhodobě skladovány po 3 a 6 měsících. Každý vzorek byl analyzován dvakrát ve dvou opakováních, výsledné hodnoty jsou průměrnými hodnotami dvou paralelních stanovení. U stanovení, které mají hodnoty kvercetinu nižší než 5 mg/kg jsou v tabulce č. 7 označeny jako < LOQ.

*Tabulka č. 7 Naměřený obsah kvercetinu ve šťávě a sirupu po tepelných úpravách a dlouhodobém skladování*

obsah kvercetinu (mg/kg)				
výrobek	var ± SD	pasterizace ± SD	po 3 měsících skladování ±SD	po 6 měsících skladování ± SD
<b>0-0-J</b>	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
<b>0-0-S</b>	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
<b>0-K-J</b>	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
<b>0-K-S</b>	< LOQ	< LOQ	5,03 ± 0,24	5,28 ± 0,01
<b>D-0-J</b>	16,4 ± 0,05	18,4 ± 2,5	19,8 ± 0,64	20,8 ± 1,7
<b>D-0-S</b>	17,6 ± 0,12	18,0 ± 0,29	21,2 ± 0,17	22,3 ± 0,82
<b>D-K-J</b>	10,1 ± 0,41	13,1 ± 0,69	13,6 ± 0,26	14,1 ± 0,84
<b>D-K-S</b>	11,3 ± 0,26	13,9 ± 0,62	14,2 ± 0,26	14,4 ± 0,34

Z grafického zpracování dat je patrné, že u výrobků 0-0-J (směs ihned lisované šťávy s vodou 1:1), 0-0-S (směs ihned lisované šťávy se sacharózou 1:1) a 0-K-J (směs ihned lisované a okyselené šťávy s vodou 1:1) byl obsah kvercetinu pod mezí stanovitelnosti. U výrobku 0-K-S (směs ihned lisované a okyselené šťávy se sacharózou 1:1) byl kvercetin nad mezí stanovitelnosti zaznamenán až po 3 a 6 měsících skladování. Nejvíce kvercetinu obsahovaly 24 hodin odležené výrobky bez okyselení – D-0-J a D-0-S (směs odležené lisované šťávy s vodou 1:1 a směs odležené lisované šťávy se sacharózou 1:1).



**Obr. 16** Změny obsahu kvercetinu ve výrobcích z bezinek

Obsah kvercetinu se u všech typů výrobků s prodlužující se dobou tepleného zpracování a skladování navýšil. Navyšování obsahu kvercetinu proběhlo i u výrobků, které nepřesáhly hodnoty 5mg/kg za celou dobu skladování. Tento trend nárůstu stanovované složky je oproti všem ostatním analytů opačný.

Navýšeným hodnotám celkového kvercetinu nejspíše odpovídá vzniklý volný kvercetin, který se uvolnil ze svých původních glykosidicky vázaných forem. Jednodenní odležení šťáv a sirupů umožnilo činnost enzymů, které štěpení realizovaly. Vzhledem k výsledkům u výrobků D-0-J a D-0-S, preferují enzymy - hydrolázy zřejmě pouze slabě kyselé prostředí.

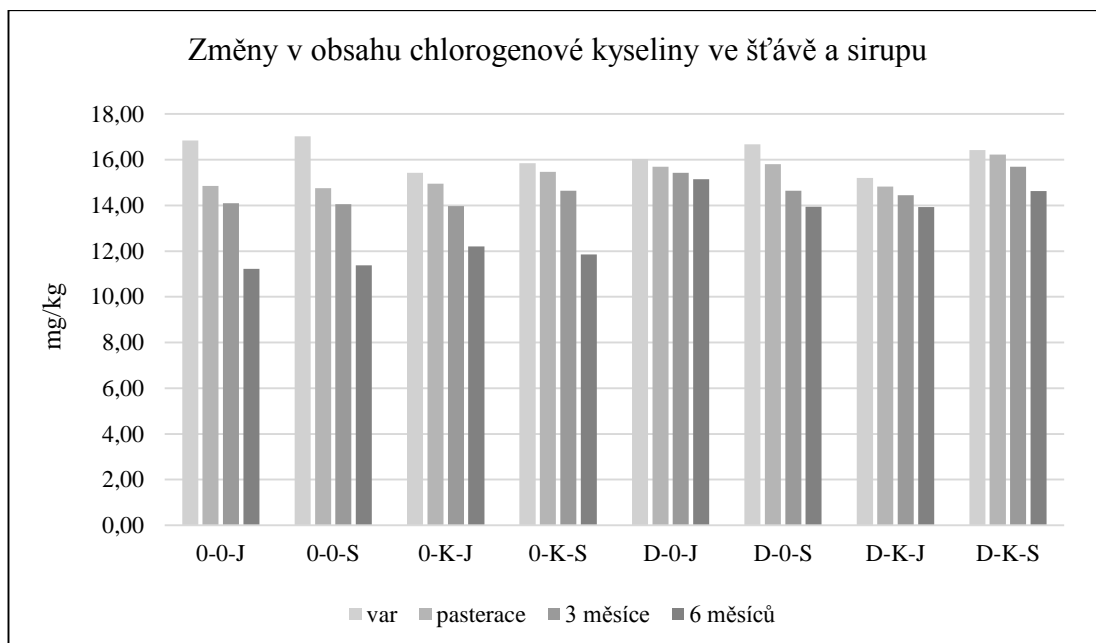
## 5.6 Stanovení obsahu chlorogenové kyseliny.

Stanovení chlorogenové kyseliny proběhlo u výrobků z bezinek chromatograficky metodou HPLC. Stanovení proběhlo pro výrobky, které prošly tepelnou úpravou a pro výrobky, které byly dlouhodobě skladovány po 3 a 6 měsících. Každý ovocný výrobek byl analyzován dvakrát ve dvou opakováních, výsledné hodnoty jsou průměrnými hodnotami dvou paralelních stanovení.

*Tabulka č. 8 Naměřený obsah chlorogenové kyseliny ve šťávě a sirupu po tepelných úpravách a dlouhodobém skladování*

obsah chlorogenové kyseliny (mg/kg)				
výrobek	var ± SD	pasterizace ± SD	po 3 měsících skladování ± SD	po 6 měsících skladování ± SD
<b>0-0-J</b>	16,9 ± 0,13	14,9 ± 0,75	14,1 ± 0,48	11,2 ± 0,28
<b>0-0-S</b>	17,0 ± 0,05	14,8 ± 0,31	14,1 ± 0,70	11,4 ± 0,38
<b>0-K-J</b>	15,4 ± 1,00	15,0 ± 0,17	14,0 ± 1,3	12,2 ± 0,61
<b>0-K-S</b>	15,9 ± 0,13	15,5 ± 0,59	14,7 ± 0,92	11,9 ± 0,26
<b>D-0-J</b>	16,0 ± 0,24	15,7 ± 0,46	15,4 ± 0,39	15,2 ± 1,1
<b>D-0-S</b>	16,7 ± 0,26	15,8 ± 0,29	14,7 ± 0,75	14,0 ± 0,41
<b>D-K-J</b>	15,2 ± 0,22	14,8 ± 0,60	14,5 ± 0,39	13,9 ± 0,56
<b>D-K-S</b>	16,4 ± 0,41	16,2 ± 0,78	15,7 ± 0,65	14,6 ± 0,32

Změny v obsahu chlorogenové kyseliny jsou poměrně ekvivalentní napříč všemi variantami výrobků. Obsah chlorogenové kyseliny se po tepelných úpravách s prodlužující dobou skladování mírně snižoval. Nejvyšší obsah chlorogenové kyseliny byl zjištěn u dvou variant výrobku 0-0-J (směs ihned lisované šťávy s vodou 1:1) a 0-0-S (směs ihned lisované šťávy se sacharózou 1:1) po varu.



**Obr. 17** Změny obsahu chlorogenové kyseliny ve výrobcích z bezinek.

Největší pokles v obsahu chlorogenové kyseliny nastal u dvou výrobků z bezinek (0-0-J a 0-0-S). Obecně byl nižší pokles obsahu chlorogenové kyseliny zaznamenán u den odležených šťáv a sirupů.



## 6 Závěr

V rámci této diplomové práce byly pro potřebu experimentů zpracovávány a využity plody planě rostoucího bezu černého v České republice z lokality Lhenicko. Jako modelové kuchyňské úpravy byly zvoleny postupy na přípravu šťávy lisováním bezinek a postup na přípravu ovocného sirupu slazeného sacharózou.

Ve zpracovávaných vzorcích byly stanoveny vybrané fenolické a biologicky aktivní látky vzhledem k různým fázím úpravy suroviny a hotových výrobků. Byly testovány postupy zpracovávající materiál ihned a po jednodenním odležení a testoval se také vliv přídavku vody a sacharózy ve stejném množství. Stanovovány byly chlorogenová kyselina, askorbová kyselina, celkový obsah antokyanů a rutin. Stanovení proběhlo metodou SPE, HPLC a spektrofotometricky.

Nejvyšší hodnoty dosáhl celkový obsah anthokyanů v sirupu 812 mg/kg, konkrétně výrobku vyrobeného z okamžitě vylisované šťávy. Z hlediska dlouhodobého skladování celkový obsah anthokyanů ve všech dílčích výrobcích klesal.

Obsah vitamínu C byl také nejvyšší u sirupu vyrobeného z okamžitě vylisované šťávy po varu, tedy 19,0 mg/kg. Oproti ostatním variantám výrobku vykazoval tento sirup celkově vyšší hodnoty vitamínu C. Z hlediska dlouhodobého skladování obsah vitamínu C klesal pod mez stanovitelnosti, tedy 5 mg/kg.

Rutin byl v nejvyšším množství stanoven u sirupu vyrobeného z okamžitě vylisované šťávy v okyselené variantě. Koncentrace naměřeného rutinu byla 291 mg/kg výrobku po varu na začátku stanovení. S prodlužujícím se skladováním obsah rutinu u všech šťáv a sirupů rovněž klesal.

Obsah kvercetinu se u všech výrobků s prodlužující se dobou tepelného zpracování a skladování zvyšoval. Výrazný rozdíl ve zvýšeném obsahu kvercetinu vykazovaly dva výrobky, šťáva a sirup s označením vyrobené z odleženého materiálu v neokyselené variantě. Nejvíce kvercetinu bylo naměřeno u tohoto sirupu v šestém měsíci skladování 22,3 mg/kg. Oproti ihned lisovaným šťávám a sirupům vykazovaly výrobky z materiálu den odleželého vyšší hladinu kvercetinu. Okyselení však u den odleželých výrobků mělo vliv na snížení hladiny kvercetinu.

Obsah chlorogenové kyseliny byl nejvyšší u sirupu vyrobeného bez odležení a v nekyselé variantě po varu, tedy 17,0 mg/kg. S postupnými tepelnými úpravami a dlouhodobým skladováním obsah chlorogenové kyseliny mírně klesal, avšak nevykazoval výrazně vyšší či hodnoty u určitých typů výrobků.

## 7 Literatura

1. ATKINSON M. D., ATKINSON E. (2002). *Sambucus nigra* L. *Journal of ecology*, 90: 895-923.
2. ARAI S., MORINAGA Y., YOSHIKAWA T., et al. (2014). Recent Trends in Functional Food Science and the Industry in Japan. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 66: 2017-2029.
3. BORS W., CHRISTA M. (2002). Chemistry of the Antioxidant Effect of Polyphenols. *Annals of the New York Academy of sciences*, 957: 57-69.
4. BOLLINGER M. (1998): *Keře*. Praha, Ikar. Průvodce přírodou (Ikar). 287 s.
5. BURDA S., OLESZEK W., LEE C. Y. (1990). Phenolic compounds and their changes in apples during maturation and cold storage. *Journal of agricultural and food chemistry*, 38: 945-948.
6. BLAŽEK J. (2001): *Ovocnictví*. 2. nezměněné. vyd. Praha, Květ. 384 s.
7. BOOTS A. W., HAENEN G. R.M., BAST A. (2008). Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *European journal of pharmacology*, 585: 325-337.
8. CARERI M., CORRADINI C., ELVIRI L., NICOLETTI I., ZAGNONI I. (2003). Direct HPLC analysis of quercetin and trans-resveratrol in red wine, grape, and winemaking byproducts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51: 5226-5231.
9. CHEN X.J., JI H., ZHANG Q.W., TU P.F., WANG Y.T., GUO B.L., LI S.P. (2008). A rapid method for simultaneous determination of 15 flavonoids in Epimedium using pressurized liquid extraction and ultra-performance liquid chromatography. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 46: 226-235.
10. *Český lékopis 2009*. Praha: Grada, 2009. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/education/detail.php?code=0096303&tab=texts>

11. DADÁKOVÁ E., KALINOVÁ J. (2010). Determination of quercetin glycosides and free quercetin in buckwheat by capillary micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Separation Science*, 33: 1633-1638.
12. DADÁKOVÁ E., VRCHOTOVÁ N., CHMELOVÁ Š., ŠERÁ B. (2011). The stability of rutin and chlorogenic acid during the processing of black elder (*Sambucus nigra*) inflorescence. *Acta alimentaria*, 40: 327-334.
13. DETRE Z., JELLINEK H., MISKULIN M., ROBERT A. M. (1986). Studies on vascular permeability in hypertension: action of anthocyanosides. *Clinical psychology and biochemistry*, 4: 143-149.
14. DE CARVALHO R. V., DA SILVA M. V., DOS SANTOS A. R., ZIELINSKI A. A. F., HAMINIUK CH W. I. (2015). Evaluation of hot and cold extraction of bioactive compounds in teas. *International journal of food science*, 50: 2038-2045.
15. DRAGLAND S., SENOO H., WAKE K., HOLTE K., BLOMHOFF R. (2003). Several culinary and medicinal herbs are important sources of dietary antioxidants. *The journal of nutrition*, 133:1286–1290.
16. DŘÍMALOVÁ D. (2005). Růstové regulátory v řasách. *Czech phycolgy*, 5: 101 - 112.
17. EIRO M. J., HEINONEN M. (2002). Anthocyanin Color Behavior and Stability during Storage: Effect of Intermolecular Copigmentation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50: 7461-7466.
18. FIUZA S. M., GOMES C., TEIXEIRA L. J., GIRÃO DA CRUZ M.T., CORDEIRO M.N.D.S., MILHAZES N, BORGES F., MARQUES M.P.M. (2004). Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties - a structure - activity relationship study. Part 1: Methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids. *Bioorganic and medicinal chemistry*, 12: 3581-3589.
19. FRESCO P., BORGES F., DINIZ C., MARQUES M. P. M. (2006). New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. *Medicinal research reviews*. 26:747-766.

20. GOMES C. A., GIRÃO DA CRUZ T., ANDRADE J. L., MILHAZES N., BORGES F., MARQUES M. P. (2003). Anticancer Activity of Phenolic Acids of Natural or Synthetic Origin: A Structure - Activity Study. *Journal of medicinal chemistry*, 46: 5395-5401.
21. GRAU J., JUNG R., MÜNKER B. (1996): *Bobulovitě, užitkové a léčivé rostliny*. Praha, Knižní klub, 287s.
22. HAMMERSTONE J. S., LAZARUS A., SCHMITZ H. H. (2000). Procyanidin content and variation in some commonly consumed foods. *The journal of nutrition*, 130: 2086-2092.
23. HERTOĞ M. G. L., HOLLMAN P. C. H., KATAN M. B. (1992). Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *Journal of agricultural and food chemistry*, 40: 2379-2383.
24. HERTOĞ M. G. L., KROMHOUT D., ARAVANIS C. et al. (1995). Flavonoid Intake and Long-term Risk of Coronary Heart Disease and Cancer in the Seven Countries Study. *Archives of internal medicine*, 155: 381-386.
25. HERTOĞ M. G. L., HOLLMAN P. C. H., KATAN M. B., KROMHOUT D. (1993). Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. *Nutrition and cancer*, 20: 21-29.
26. HOSSEINZADEH H., NASSIRI-ASL M. (2014). Review of the protective effects of rutin on the metabolic function as an important dietary flavonoid. *Journal of endocrinological investigation*, 37: 783-788.
27. HUNG P. V., MORITA N. (2008). Distribution of phenolic compounds in the graded flours milled from whole buckwheat grains and their antioxidant capacities. *Food chemistry*, 109: 325-331.
28. KALACĀ P. (2001): *Organická chemie přírodních látek a kontaminantů*. Vyd. 1. České Budějovice, Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, 120 s.
29. KASTNEROVÁ M. (2014): *Výživové poradenství v praxi: vědecká monografie*. České Budějovice, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 273 s.

30. KIMIRA M., ARAI Y., SHIMOI K., WATANABE S. (1998). Japanese Intake of Flavonoids and Isoflavonoids from Foods. *Journal of epidemiology*, 8: 168-175.
31. KINGHORN A., LEE J. GU, PEZZUTO J. (2003). Cancer Chemopreventive Agents Discovered by Activity-Guided Fractionation: An Update. *Current organic chemistry*, 7: 213-226
32. KIRK P., PATTERSON R. E., LAMPE J. (1999). Development of a Soy Food Frequency Questionnaire to Estimate Isoflavone Consumption in US Adults. *Journal of the american dietetic association*, 99: 558–563.
33. KOYUNCU M. A., DİLMAÇÜNAL T. (2010). Determination of Vitamin C and Organic Acid Changes in Strawberry by HPLC During Cold Storage. *Notulae botanicae horti agrobotanici cluj- napoca*, 38: 95-98.
34. KRÁL, J. (1998). Rozmnožovanie menej známých ovocných druhov. *Zahradkár*, 34: 10-11.
35. KÜHNAU J. (1976). The Flavonoids. A Class of Semi-Essential Food Components: Their Role in Human Nutrition. *World review of nutrition and dietetics*, 24: 117-191.
36. LA CASA C., VILLEGAS I., ALARCÓN DE LA LASTRA C., MOTILVA V., MARTÍN CALERO M. J. (2000). Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. *Journal of ethnopharmacology*, 71: 45-53
37. LACHMAN, J. a kol. (2005). Červeně a modře zbarvené brambory významný zdroj antioxidantů v lidské výživě. *Chemické listy*, 99: 474 - 482.
38. LEE B. M., PARK K. K. (2003). Beneficial and adverse effects of chemopreventive agents. *Mutation research/Fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis*, 523: 265–278.
39. LEE J., FINN C. E. (2007). Anthocyanins and other polyphenolics in American elderberry (*Sambucus canadensis*) and European elderberry (*S. nigra*) cultivars. *Journal of science of food and agriculture*, 87: 2665–2675.

40. LIETTI A., CRISTONI A., PICCI M. (1976). Studies on *Vaccinium myrtillus* anthocyanosides. I. Vasoprotective and antiinflammatory activity. *Arzneimittelforschung*, 26: 829-32.
41. MATĚJÍČEK A. (2013): Metodika pěstování kulturních odrůd bezu černého. Holovousy: Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy, 46 s.
42. MATĚJKOVÁ Š., GUT I. (2000). Polyfenoly v potravě jako protektivní látky v aterosklerotickém procesu. *Remedia*, 10: 272-281.
43. LE MARCHAND L. (2002). Cancer preventive effects of flavonoids-a review. *Biomed pharmacother*, 56: 296-301.
44. MENG S., CAO J., FENG Q., PENG J., HU Y. (2013). Roles of chlorogenic acid on regulating glucose and lipids metabolism: A review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013: 11s.
45. MÍKA V. (2001): Fenolické látky v lučních rostlinách. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 116s.
46. REINLI K., BLOCK G. (1996). Phytoestrogen content of foods-a compendium of literature values. *Nutrition and cancer*, 26: 123-48.
47. SANTANA-GALVARÉZ J., CISNEROS-ZEVALLOS L., JACOBO-VELÁZQUEZ D. A. (2017). Chlorogenic Acid: Recent Advances on Its Dual Role as a Food Additive and a Nutraceutical against Metabolic Syndrome. *Molecules*, 22: 358.
48. SCALBERT A., WILLIAMSON G. (2000). Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *The journal of nutrition*, 130: 2073-2085.
49. SHAHIDI F., JANITHA P. K., WANASUNDARA P. D. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical reviews in food science and nutrition*, 23: 67-103.
50. SKROVANKOVA S., SUMCZYNSKI D., MLCEK J., JURIKOVA T., SOCHOR J. (2015). Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries. *International journal of molecular sciences*, 16: 24673-24706.
51. SLANINA J., TÁBORSKÁ E. (2004). Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. *Chemické listy*, 98: 239-245.

52. SLAVÍK B., ŠTĚPÁNKOVÁ J. (2011): *Květena České republiky*, Praha: Academia, 580s.
53. ŠIŠÁK L. (2006). Importance of non-wood forest product collection and use for inhabitants in the Czech Republic. *Journal of forest science*, 52: 417–426.
54. VELÍŠEK J. (2002a): *Chemie potravin 2*, Vyd. 2. uprav. Tábor: OSSIS, 320s.
55. VELÍŠEK J. (2002b): *Chemie potravin 3*, Vyd. 2. uprav. Tábor: OSSIS, 343s.
56. WAISSER K. (2004): *Úvod do biologické aktivity organických sloučenin*, Hradec Králové: Gaudeamus, 122s.
57. WAKAI K., EGAMI I., KATO K., KAWAMURA T., TAMAKOSHI A., LIN Y., NAKAYAMA T., WADA M., OHNO Y. (1999). Dietary intake and sources of isoflavones among Japanese. *Nutrition and Cancer*, 33:139-145.



## **8 Přílohy**

### **8.1 Použité zkratky**

HPLC (high-performance liquid chromatography) vysokoúčinná kapalinová chromatografie

UV (ultraviolet) ultrafialové záření

VIS (visible) viditelné záření

SPE (solid phase extraction) extrakce na pevné fázi

LOQ (limit of quantification) mez stanovitelnosti

CHA (chlorogenic acid) chlorogenová kyselina

Q (quercetin) kvercetin

R (rutin) rutin