



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**ZISK A KOMPLEXNÍ CHARAKTERIZACE EXTRAKTŮ
ARONIE**

OBTAINING AND COMPLEX CHARACTERIZATION OF ARONIA SPP. EXTRACTS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Kateřina Seidlová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. Mária Veselá, Ph.D.

BRNO 2020

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1448/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Kateřina Seidlová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **RNDr. Mária Veselá, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Zisk a komplexní charakterizace extraktů aronie

Zadání diplomové práce:

1. Zpracujte literární přehled dané problematiky:
 - charakteristika, složení a vlastnosti aronie
 - účinné látky aronie s antimikrobiálním a antioxidačním potenciálem, jejich význam a možnosti využití v potravinářství a kosmetice
 - těkavé (aromatické) látky aronie
 - možnosti získávání extraktů účinných látek z ovoce
 - možnosti stanovení aromaticky aktivních látek v extraktech z ovoce – princip, provedení, přehled aplikací
 - možnosti měření antioxidační aktivity extraktů z ovoce – princip, provedení, přehled aplikací
2. Vyzkoušejte různé systémy extrakce/macerace uvedeného rostlinného materiálu pro zisk extraktu (esenciálního oleje) s ohledem na max. výtěžnost a optimální složení
3. Získané esenciální oleje charakterizujte z hlediska obsahu účinných látek (antioxidanty, aromatické látky aj.)

Termín odevzdání diplomové práce: 31.7.2020:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Kateřina Seidlová
student(ka)

RNDr. Mária Veselá, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Aronie (*Aronia melanocarpa*) je bobulovitý plod charakteristických sensorických vlastností, který vykazuje určité léčivé účinky. Hlavními bioaktivními složkami aronie jsou polyfenolické látky s významnou skupinou antokyanových barviv. Bioaktivní látky se z přírodních materiálů tradičně získávají extrakcí, v práci byly porovnány 2 druhy extrakce – macerace a PHWE. Na základě obsahu polyfenolických látek byla vybrána macerace jako vhodnější metoda a ta byla optimalizována pomocí statistického modelu plánovaného experimentu.

Optimální podmínky macerace byly stanoveny na teplotu 30 °C, rozpouštědlo – 50% etanol, navážka 10 g na 50 ml a doba extrakce 30 min. Takto připravený extrakt měl výsledný obsah polyfenolů 1441 ± 90 mg/100 g DW, antokyanů 943 ± 8 mg/100 g DW a celková antioxidační aktivita pomocí ABTS $24,78 \pm 0,09$ $\mu\text{molTE/g}$. Těkavých látek s obsahem nad 0,5 % bylo identifikováno 25 a z nich měly největší zastoupení aldehydy a estery. V optimálním extraktu převažoval benzaldehyd s 32,25 % a methylhexanoát s 21,37 %.

ABSTRACT

Aronia (Aronia melanocarpa) is a berry fruit with distinctive sensory characteristics and health-promoting properties. Polyphenols are the main bioactive compounds found in aronia including natural pigments – anthocyanins. Bioactive compounds are usually obtained from natural materials by extraction, in this work, two methods of extraction were compared – maceration and PHWE. Based on the total phenolic content, maceration was chosen as a more suitable method and then was optimized with statistical model – Design of Experiment.

Optimal conditions were set to temperature of 30 °C, extraction agent 50 % ethanol, solid-solvent ratio 10 g per 50 ml and time of extraction for 30 minutes. Extract obtained under these conditions was characterised by total phenolic content – 1441 ± 90 mg/100 g DW, total anthocyanin content 943 ± 8 mg/100 g DW and antioxidation activity by ABTS $24,78 \pm 0,09$ $\mu\text{molTE/g}$. In total of 25 volatile compounds were indentified in the optimal extract with content $> 0,5$ %. Major part created aldehydes and esters, with the main compounds being benzaldehyde (32,25 %) and methyl hexanoate (21,37 %).

KLÍČOVÁ SLOVA

aronie, aromatické látky, antioxidanty, antokyaniny, extrakce, PHWE, SPME, GS-MS, plánovaný experiment

KLÍČOVÁ SLOVA

aronia, aroma compounds, anthocyanins, antioxidants, extraction, PHWE, SPME, GC-MS, DOE

SEIDLOVÁ, Kateřina. *Zisk a komplexní charakterizace extraktů aronie*. Brno, 2020. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/124220>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Mária Veselá.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že jsem všechny použité literární zdroje správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické Vysokého učení technického v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT v Brně.

.....

Podpis studenta

Poděkování:

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala mé konzultantce paní doc. Ing. Eva Vítové, Ph.D., za veškerou pomoc, cenné rady a připomínky, za věnovaný čas a odborné vedení mé diplomové práce. Děkuji Ing. Lence Burdějové, Ph.D z Ústavu analytické chemie Akademie věd v Brně za poskytnutí přístroje k měření, za ochotu, pomoc a přátelský přístup.

Obsah

1. Úvod	8
2. Teoretická část	9
2.1. Aronie a její vlastnosti.....	9
2.2. Chemický profil aronie	10
2.2.1. Aromatické látky aronie	11
2.2.2. Fenolické látky aronie	12
2.2.3. Prokyanidiny	13
2.2.4. Antokyany v aronii.....	14
2.3. Biologická aktivita aronie	15
2.3.1. Antioxidační schopnosti	15
2.3.2. Preventivní účinek bioaktivních látek aronie.....	16
2.4. Využití plodů aronie	17
2.5. Nežádoucí účinky aronie	18
2.6. Metody vhodné pro extrakci účinných látek z aronie	18
2.6.1. Konvenční techniky.....	19
2.6.2. Moderní techniky	21
2.7. Metody vhodné pro stanovení bioaktivních látek v aronii	23
2.7.1. Celkový obsah fenolů	23
2.7.2. Celkový obsah antokyanových barviv	23
2.7.3. Stanovení antioxidační aktivity pomocí abts ⁺⁺	24
2.7.4. Uv-vis spektrofotometrie	25
2.7.5. Stanovení těkavých látek	25
3. Experimentální část	28
3.1. Laboratorní vybavení.....	28
3.2. Analyzované vzorky.....	28
3.3. Získ extraktů aronie.....	29
3.3.1. Extrakce/macerace	29
3.3.2. Extrakce horkou vodou.....	29
3.4. Použité metody stanovení jednotlivých charakteristik	30
3.4.1. Stanovení celkového obsahu fenolů podle folin-ciocalteua	30
3.4.2. Stanovení obsahu antokyanových barviv ph diferenciální metodou.....	30
3.4.3. Stanovení celkové antioxidační aktivity pomocí abts* radikálu.....	31

3.4.4.	Stanovení těkavých látek	32
3.5.	Statistické zpracování výsledků	33
4.	Výsledky a diskuze.....	34
4.1.	Optimalizace extrakce/macerace.....	34
4.1.1.	Úvodní screening faktorů	34
4.1.2.	Plánovaný experiment (doe).....	40
4.2.	Hodnocení extrakce stlačenou horkou vodou (phwe)	42
4.2.1.	Stanovení optimální teploty pro phwe.....	43
4.2.2.	Sledování vlivu navážky při phwe	44
4.2.3.	Porovnání extrakčních cyklů	45
4.3.	Stanovení těkavých látek v phwe extraktech při různých teplotách	46
4.3.1.	Změna složení identifikovaných těkavých látek při se vzrůstající teplotou.....	50
4.4.	Charakterizace optimálního extraktu.....	53
4.4.1.	Celkový obsah polyfenolů, antokyanů a antioxidační aktivita	53
4.4.2.	Těkavé látky v optimálním extraktu.....	54
5.	Závěr.....	58
6.	Použitá literatura	59
7.	Použité zkratky.....	69
8.	Přílohy	70

1. ÚVOD

Aronie (*Aronia melanocarpa*) je jedním z běžně pěstovaných bobulovitých plodů u nás. Už američtí Indiáni pozorovali její léčivé účinky na lidský organismus. Tyto bioaktivní vlastnosti jsou založeny na vysoké antioxidační aktivitě hlavních chemických komponent. Nejaktivnějšími sloučeninami jsou fenolické látky a zejména jejich podskupina antokyanů. Antokyany zároveň aronii dávají její charakteristickou sytě rudou až černou barvu, která se extrahuje i do extraktů. Díky těmto barvivům se aronie stala populární v Sovětském svazu, ze kterého se rozšířila do zbytku Evropy v druhé polovině 20. století. Tam se jako první začala ve velkém průmyslově využívat jako přírodní potravinářské barvivo. Postupně se do podvědomí dostaly i její pozitivní účinky na lidský organismus a jako přidaná nutriční hodnota se začala přidávat do různých ovocných šťáv a čajů. Nyní se výzkum soustředí na prokázání jejich léčivých účinků a možné využití v lékařské praxi a na zefektivnění extrakce jejich bioaktivních složek různými moderními metodami.

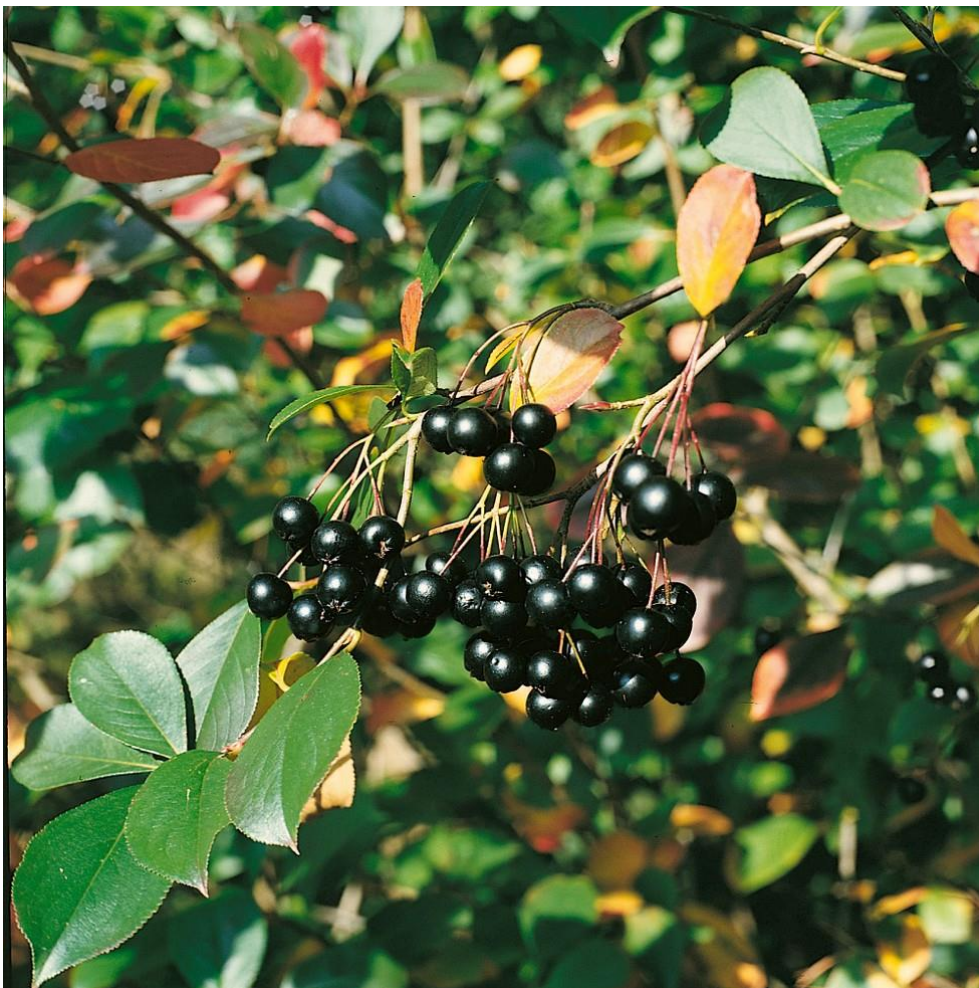
Tato práce se zabývá optimalizací procesu získávání extraktů aronie s cílem dosáhnout maximálního zisku bioaktivních sloučenin – polyfenolů. Za tímto účelem je porovnána konvenční metoda macerace a nekonvenční metoda extrakce horkou vodou. Pro optimalizaci macerace/extrakce byl vytvořen statistický model plánovaného experimentu. Který byl navržen na základě předběžných stanovení. Získaný extrakt byl následně charakterizován z hlediska obsahu těkavých látek, polyfenolických látek, antioxidační aktivity a anthokyanových barviv. V rámci extrakce horkou vodou byla zkoumána závislost množství těkavých sloučenin na teplotě.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Aronie a její vlastnosti

Aronie je keřovitá rostlina, která původně pochází ze Severní Ameriky, zejména východního pobřeží USA a Kanady. V průběhu 19. století se dostala do Ruska, kde získala největší popularitu v dobách Sovětského svazu, ze kterého se v druhé polovině 20. století začala šířit do střední a severní Evropy [1]. Tyto země si také vypěstovaly vlastní odrůdy, například českou je Nero, finskou Viking a dánskou je Aron [2]. Její produkce byla a stále je spojena s výrobou džusů, džemů, vína a přírodních rostlinných barviv. Kromě toho se také pěstuje jako okrasná rostlina. Tento opadavý keř má plody temně rudé až černé barvy (podle dané odrůdy) [1].

Čerstvé bobule jsou charakteristické kyselou a velmi silnou svíravou a trpkou chutí, podle které se aronie anglicky nazývá chokeberry a u většiny lidí není aronie v syrovém stavu oblíbená a z toho důvodu se jako čistá šťáva spíše nepoužívá. Na druhou stranu v kombinaci s jablečnou, hruškovou nebo rybízovou šťávou jsou její nepříjemné tóny omezeny [2]. Díky takovému zlepšení sensorických vlastností se aroniová šťáva stává žádanou prevencí proti degenerativním chorobám.



Obrázek 1 *Aronia melanocarpa* [3]

Tabulka 1 Taxonomické zařazení druhů aronie [3]

říše	rostliny (<i>Plantae</i>)
podříše	vyšší rostliny (<i>Cormobionta</i>)
oddělení	krytosemenné (<i>Magnoliophyta</i>)
třída	vyšší dvouděložné (<i>Rosopsida</i>)
řád	růžotvaré (<i>Rosales</i>)
čeleď	růžovité (<i>Rosaceae</i>)
rod	temnoplodec (<i>Aronia</i>)
druh	Temnoplodec černoplodý (<i>Aronia melanocarpa</i>)
	Temnoplodec planikolistý (<i>Aronia arbutifolia</i>)
	Temnoplodec třešňolistý (<i>Aronia prunifolia</i>)

Tento keř patří do čeledi růžovité (*Rosaceae*) (viz Tabulka 1), česky se nazývá také černý jeřáb nebo temnoplodec, a dorůstá výšky dvou až tří metrů. Bílé květy se objevují začátkem května až června a dozrávají do sytě červených až černočervených plodů-bobulí, které jsou sbírány v srpnu a září [2].

Druhy aronie jsou dva – *Aronia melanocarpa*, s bobulemi až do černa, a *Aronia arbutifolia*, s bobulemi do červena. Dále se pěstuje jejich hybrid (některými odborníky uznáván jako samostatný rod) *Aronia prunifolia* [4]. *Aronia melanocarpa* je nejčastěji pěstovaným druhem a mezi nejdůležitější kultivary patří Viking (Finsko), Nero (Česká republika), Aron (Dánsko), Kurkumacki (Finsko), Hugin (Švédsko), Fertodi (Maďarsko) a Rubina (kříženec ruských a finských rostlin) [2].

2.2. Chemický profil aronie

Chemické složení plodů je závislé na několika faktorech jako jsou kultivar, hnojení, lokalita, úroveň zrání, doba sklizně a další [2]

Podle publikace Kulling a Rawel [2] tvoří sušinu 17-29 % a ve vodě rozpustnou část 5-10 %. Dále autoři uvádějí aronii jako dobrý zdroj vlákniny o obsahu 5,62 g/100 g čerstvé váhy (FW, fresh weight), obsah celulózy, hemicelulózy a ligninu je také vysoký. Nawirska a Kwaśniewska [5] stanovily sušinu v aroniových výliscích na 90,83 %, z toho vlákninu tvořilo 95,77 % – hemicelulózy v koncentraci 32,1/100 g suché váhy (DM, dry matter), celulózy v koncentraci 31 g/100 g DM a lignin 23,3 g/100 g DW. Kulling a Rawel [2] uvádějí nízký obsah pektinu v čerstvých plodech – 0,3-0,6 %. Mírně vyšší obsah pektinu 0,6-0,7 % uvádí ve své práci Kokotkiewicz a kol. [1]. Kokotkiewicz tento obsah pektinu komentuje jako vysoký, díky čemuž jsou čerstvé bobule aronie tak vhodné pro produkci džemů.

Obsah cukrů se v obou člancích shoduje a to hodnotou 16-18 % [2] a 10-18 % [1]. Dále je aronie zdrojem sorbitolu a parasorbitolu. Sorbitol byl enzymaticky stanoven na $80 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a v čerstvě vymačkané šťávě na $56 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Toto jsou oproti ostatním bobulovitým plodům vysoké koncentrace a je tedy možné navrhnout, že se obsah sorbitolu použije jako biomarker pro autenticitu potravin [2].

Tuků a bílkovin je v aroniových bobulích jen malé množství. Nejvyšší obsah bílkovin byl vyhodnocen na $3,7 \text{ g}/100 \text{ g DM}$ ovoce [6] [7]. Lipidy tvoří pouze mezi 0,09-0,17 % složení čerstvé bobule a jejich nejvyšší koncentrace je v peckách a slupkách [7]. Nejvíce jsou zastoupeny kyselina linolová a fosfolipidy (fosfatidylcholin, fosfatidylinositol a fosfatidylethanolamin) [4].

Z vitamínů se v čerstvých bobulích aronie vyskytují prakticky všechny – vitamin C, vitaminy B skupiny – B1, B2, B6, niacin, dále kyselina pantotenová, listová, vitamin K i tokoferol. Z minerálů jsou zastoupeny nejčastější stopové prvky Na, K, Ca, Mg, Fe a Zn [2].

Celkový obsah organických kyselin je relativně nízký v porovnání s jinými bobulemi, tvoří okolo 1–1,5 %. Z organických kyselin se v čerstvých bobulích nachází L-malát, citrát a sukcinát. Výsledné pH čerstvé šťávy je potom kolem hodnoty 3,3-3,9 [2] [8].

2.2.1. Aromatické látky aronie

Aromatické látky se v rostlinných materiálech tvoří dvěma způsoby. Prvním z nich je tvorba přímo v rostlině v době zrání, jako například tvorba terpenoidů z izoprenových jednotek. Druhým mechanismem je degradace biochemických sloučenin v průběhu technologického zpracování vlivem teploty a enzymů. Prekurzory jsou v tomto případě vysokomolekulární látky, jakými jsou bílkoviny, sacharidy, lipidy [9] [10]. Zajímavou vlastností těkavých látek je fakt, že aromaticky aktivní jsou spíše ty vyskytující se v malých koncentracích, než ty s vysokým obsahem [9].

Jak bylo zmíněno, čerstvé plody aronie mají velmi výraznou hořkou chuť. Nejaktivnější aromatickou složkou je totiž amygdalin. Tento kyanogenní glykosid se v bobuli aronie vyskytuje v koncentraci $20,1 \text{ mg}/100 \text{ g}$, v čerstvě vymačkané šťávě dosahuje hodnoty $5,75 \text{ mg}/100 \text{ g}$ a ve výliscích $52,3 \text{ mg}/100 \text{ g FW}$ [2]. Pro rostliny rodu růžovité je typická přítomnost amygdalinu a aronie není výjimkou.

Mezi těkavými látkami, stanovenými pomocí plynové chromatografie (GC) a hmotnostní spektrometrie (MS), je zdokumentován nejvýznamnější podíl benzaldehyd-kyanohydridu, kyanovodíku a benzaldehydu [2].

Dalšími aromatickými látkami aronie jsou:

- benzaldehyd-kyanhydrin
- 2-methylpropan-1-ol
- kyselina octová
- 2-methylpropanová kyselina
- 3-penten-2-on
- 3,9-epoxy-p-menth-1-en

a deriváty benzenu:

- benzylalkohol
- 2-fenylethanol
- fenylacetaldehyd
- salicylaldehyd
- acetofenon
- 2-hydroxyacetofenon
- 4-methoxyacetofenon
- fenol
- 2-methoxyenol
- methyl-benzoát [11] [12].

Profilem těkavých látek aronie se zabývali Kraujalyte a kol. [12], Butorová a kol. [13] a jako první těkavé sloučeniny aronie identifikovali Hirvi a Honkanen v roce 1985 [14]. Hirvi a Honkanen identifikovali 48 těkavých sloučenin, z nichž hlavní byly benzaldehyd, benzaldehyd-kyanhydrin a kyanovodík. Mezi deriváty benzenu identifikovali v aroniové šťávě benzylalkohol, 2-fenyletanol, methyl benzoát a další [14]. Butorová a kol. [13] identifikovali v syrových bobulích aronie 39 těkavých sloučenin. Největší zastoupení měly skupiny alkoholů a aldehydů, v minoritním množství ketony, estery, kyseliny a terpeny. Autoři sledovali vliv odrůdy a klimatických podmínek na obsah těkavých látek, a zjistili vyšší obsah alkoholů, než například autoři Kraujalyte a kol. [12]. Kraujalyte a kol. [12] porovnávali dva genotypy aronie a dohromady identifikovali 74 těkavých látek, největší obsah měly 3-penten-2-on, 3,9-epoxy-p-menth-1-en a benzaldehyd. Pomocí olfaktometrie ze všech těkavých látek určili 22 jako aromaticky aktivní, z nichž nejdůležitější pro celkové aroma aronie jsou ethyl-2-methyl butanoát, ethyl-3-methyl butanoát, ethyl dekanóat a nonanal [12].

2.2.2. Fenolické látky aronie

Polyfenoly jsou skupina sekundárních metabolitů, které rostliny tvoří za účelem ochrany proti ultrafialovému záření a patogenům [15]. Chemicky patří mezi hydroxysloučeniny s aromatickým kruhem a jejich biologická aktivita se odvíjí od schopnosti lehce se oxidovat. Nejčastěji se vyskytují ve velkém množství v ovoci, zelenině, obilninách a nápojích a mohou být zodpovědné za hořkou a svíravou chuť. Jejich antioxidační aktivita dokáže neutralizovat nežádoucí kyslíkové a dusíkové radikály, které jsou tvořeny jako vedlejší produkty metabolických reakcí v těle. Epidemiologové došli k závěrům, že aktivita polyfenolů je dostatečná jako ochrana vůči chronickým nemocem, jako jsou kardiovaskulární choroby, rakovina, cukrovka, infekce a další [15]. Fenolické látky jsou syntetizovány přes metabolismus šikimátu a malonátu [16] [17].

Polyfenoly jsou často propojeny s dalšími sloučeninami jako karboxylové kyseliny, organické kyseliny, aminy, lipidy nebo další fenoly. Skupina fenolických látek se nejčastěji dělí do čtyř skupin na fenolické kyseliny, flavonoidy, stilbeny a lignany, a to podle počtu fenolů [15] [18].

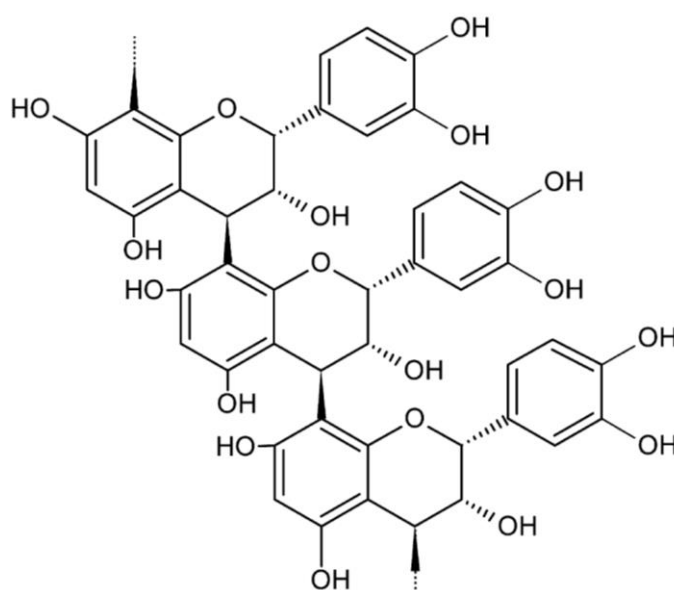
Flavonoidy jsou nejrozšířenější skupinou polyfenolů v lidské stravě. Jejich základní strukturu tvoří dva aromatické kruhy vzájemně propojené třemi uhlíkovými atomy, které s atomem kyslíku tvoří heterocyklus. Jeden z cyklů je obvykle tvořen z molekuly resorcinolu a druhý

přes biosyntetickou dráhu šikimátu. Flavonoidů bylo identifikováno více než 4000 druhů a mnohé z nich jsou rostlinnými barvivy, které lze najít jak v květech, tak i plodech a listech. Flavonoidy se dají dále dělit podle variací v základním heterocyklu, kde jednou z podkategorií jsou antokyany – barviva zodpovědná za tmavě červené zbarvení aronie [15].

Obsah polyfenolů není v rámci jedné rostliny jednotný, obvykle je vyšší ve vnějších částech. Jejich obsah v potravinách je významně ovlivněn environmentálními i edafickými faktory jako jsou půda, sluneční svit, počet srážek a také důležitým faktorem je proces zrání. Při zrání se mění koncentrace a rozložení jednotlivých polyfenolů, obecně lze říct, že obsah fenolických kyselin se snižuje, a naopak antokyaninů roste [15]. Nárůst polyfenolů je možné pozorovat při stresu, takže například při infekci se může jejich obsah zvyšovat. V neposlední řadě koncentrace polyfenolů závisí na skladování a zpracování [15] [18]. Fenolické sloučeniny tvoří největší a nejdůležitější část chemického profilu aronie. Celkový obsah polyfenolů, jak už bylo řečeno, se velmi liší podle odrůdy, kultivačních podmínek apod., ale pohybuje se v rozmezí přibližně od 700 do 8000 mg/100 g suché váhy [1] [2] [19]. Studií na celkový obsah polyfenolů byla napsána celá řada, v posledních několika letech se vědci zaměřují zejména na optimalizaci extrakce, jako Čujić a kol. [20], Ramić a kol. [21], nebo na výzkum léčivých účinků aronie. Například Kozuka a kol. [22] v letošním roce publikoval článek zaměřující se na izolaci HMG-CoA reductázy z aroniové šťávy.

2.2.3. Prokyanidiny

Jako nejpodstatnější podskupina fenolických látek byly v aronii identifikovány prokyanidiny [1]. Obecně se dají popsat jako oligomerní (2-10 jednotek) a polymerní (více než 10 jednotek) (+)-katechiny a (-)-epikatechiny, jejichž základní jednotkou je flavan-3-ol. Tyto podjednotky jsou v aronii spojeny výhradně vazbami C4→C8 a C4→C8, tento typ se značí jako takzvaný typ B. Stupeň polymerizace je u aronie 2-23, s tím že jsou dokumentovány i kondenzace nad 30 [1] [2]. Jejich obsah byl stanoven na 5182 mg/100 g suché váhy s kondenzací 23 [23].

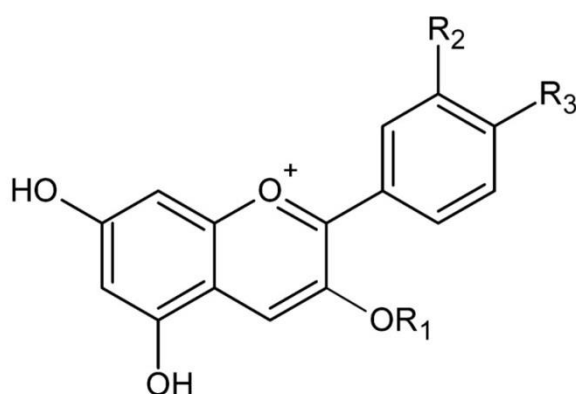


Obrázek 2 Chemická struktura polymerního prokyanidinnu s C4→C8 vazbami (upraveno podle [1]).

2.2.4. Antokyany v aronii

Antokyany jsou přírodními ve vodě rozpustnými rostlinnými barvivy. Vyskytují se v mnoha rostlinách, zejména jejich květech a plodech, které mají modré, červené nebo fialové zbarvení. Chemicky patří do podskupiny polyfenolických látek – flavonoidů s tím rozdílem, že antokyany mají kladný náboj na atomu kyslíku v klasické cyklické struktuře flavonoidů [24]. Jejich stabilita je ovlivněna změnou pH, působením světla a tepla. Vliv pH je zřejmý při přesunu z kyselého do alkalického prostředí, pigment, který se jevil jako červený, se přesune do modrých odstínů [24].

Po sloučení antokyanidinů s cukry vznikají antokyany [25]. V červeném ovoci je nejčastěji 3-glukosid, ze kterého vzniká nejběžnější kyanidin-3-glukosid. Stabilita je ovlivněna pH, při jeho změně dochází k protonaci a deprotonaci, která mění rozmístění elektronů a zároveň tak



kyanidin-3-O-galaktosid	R1 = gal	R2 = OH	R3 = OH
kyanidin-3-O-glukosid	R1 = glu	R2 = OH	R3 = OH
kyanidin-3-O-xylosid	R1 = xyl	R2 = OH	R3 = OH
kyanidin-3-O-arabinosid	R1 = ara	R2 = OH	R3 = OH
pelargonidin-3-O-arabinosid	R1 = ara	R2 = H	R3 = OH
pelargonidin-3-O-galaktosid	R1 = gal	R2 = H	R3 = OH

Obrázek 3 Chemické struktury antokyaninů v *A. melanocarpa* (upraveno podle [1]).

mění barvu a absorpční vlnovou délku [25]. Tmavě zbarvené bobule jsou nejvýznamnějšími zdroji dalších antokyanů, jako jsou 3-galaktosid, 3-xylosid, 3-arabinosid, pelargonidin-3-galaktosid a pelargonidin-3-arabinosid [18].

Bylo pozorováno, že oproti polyfenolům jejich koncentrace se zráním roste [15]. Zároveň je zajímavé, že i přesto, že jejich obsah je závislý na odrůdě, tmavší ovoce ho má vyšší, zastoupení jednotlivých antokyanů zůstává stejné [18]. V čerstvém ovoci je jejich obsah v rozmezí od 307 do 1480 mg/100 g a v sušené formě byly zdokumentovány hodnoty od 641 do 1959 mg/100 g [2]. Antokyany v aronii studovalo množství autorů a velký rozptyl naměřených hodnot je dán hlavně různým typem studovaného materiálu – aronie ve formě šťávy, výlisků, v syrovém nebo sušeném stavu. Hudec a kol. [26] analyzovali čerstvé bobule (uchované zmražené po dobu maximálně jednoho týdne do samotného experimentu) 20

aroniových keřů odrůdy Nero. Antokyany extrahovali okyseleným metanolem a stanovili pH diferenciální metodou průměrně na 6408 mg·kg⁻¹. Oszmiański a Wojdyło [23] studovali aronii ve formě bobulí, šťávy a výlisků, aby určili nejen jednotlivé nízko a vysokomolekulární polyfenoly, ale i jejich antioxidační aktivitu. Pro stanovení celkového obsahu antokyanů využili HPLC, která je na toto stanovení používána často. Došli k výsledkům, že polymerní proantokyany, a především (-)epikatechin, jsou hlavní skupinou polyfenolů v aronii, kde tvoří 66 % všech polyfenolů. Rozsah naměřených hodnot antokyanů byl od 1878,79 mg/100 g DW pro aroniovou šťávu, do 8191,58 mg/100 g ve výliscích. S těmito hodnotami korelovala antioxidační aktivita, která byla nejvyšší ve výliscích a nejnižší ve šťávě [23].

2.3. Biologická aktivita aronie

Jak již bylo výše zmíněno, aronie má vysoký obsah polyfenolických látek, který se projevuje vysokou biologickou aktivitou [18]. Protože chuť čerstvé bobule není nejlákavější, je důležité zmínit, proč je vlastně aronie přidávána do potravinářských výrobků nejen jako barvivo, ale také jako složka zvyšující nutriční hodnotu. Aronie není sice vedena jako léčivá látka, ale její pozitivní účinky na lidské zdraví jsou zkoumány už desítky let, a s kladnými výsledky. Příznivě působí na celou řadu metabolických systémů, které podléhají významným civilizačním chorobám. Všeobecný antioxidační efekt je přičítán polyfenolům a byl potvrzen v řadě studií [18].

Výzkum vlivu šťáv a extraktů aronie se zaměřuje hlavně na léčbu metabolického syndromu. Metabolický syndrom je lékařský pojem pro několik vzájemně propojených příznaků, které se obvykle projevují současně. Patří mezi ně obezita, hypertenze, dyslipidemie, rezistence vůči inzulinu a glukóze. Tyto příznaky poté přímo způsobují civilizační choroby jako cukrovku druhého typu, aterosklerózu a další [27].

Biologická dostupnost

Plody aronie mají velký léčivý a antioxidační potenciál, ale to, jak se v lidském těle využijí, záleží na biologické dostupnosti jednotlivých složek. Koncentrace není významným parametrem, vstřebávání látek z potravy závisí na jejich chemické struktuře. Tento fakt byl popsán díky rozdílným výsledkům mezi *in vitro* a *in vivo* studiemi. Většina polyfenolických sloučenin z potravin se nevstřebává v nativní formě, ale hydrolyzují se ve střevě a při absorpci jsou ve velké míře modifikovány. Hydrolyza může probíhat buď pomocí enzymů tenkého střeva, nebo tamní mikroflórou. Modifikace při absorpci probíhá v játrech, kde polyfenoly podléhají metylaci, sulfonaci a/nebo glukuridinaci [15] [24].

2.3.1. Antioxidační schopnosti

Význam aronie jako rostliny s léčivými vlastnostmi tedy stojí na antioxidačních atributech fenolických látek. Tyto sekundární metabolity chrání ovoce před oxidací světlem, vzduchem a mikrobiálními faktory, a v těle pak zřejmě působí proti proliferaci buněk, anti-diabeticky, antirakovinně, protizánětlivě, antivirově a posilují kardiovaskulární systém. Obecný mechanismus je založen na stabilizaci volného elektronu delokalizací na aromatickém kruhu fenolu [25]. Z fenolických látek aronie jsou nejlepšími antioxidanty antokyany. Antokyanidin má strukturu složenou z chalkonové a quinoinalní báze, které podporují antioxidační aktivitu

díky dvojitým vazbám konjugovaným vůči ketonové skupině [24]. Tyto dvojitě vazby dokážou vychytávat volné radikály, a tím výrazně snížit jejich negativní oxidační efekt na organismus. Stejně tak k této aktivitě přispívá glykosylovaný B-cyklus antokyaninu, jehož prospěšné vlastnosti jsou ještě umocněny ortohydroxylací a metoxylací [24]. Další modifikací přispívající ke zvýšené antioxidační aktivitě je acylace a diacylace antokyaninu fenolickou kyselinou, naopak 5-glykosylací se antioxidační aktivita redukuje [24].

Při porovnání aronie s podobnými bobulemi na základě eliminace kyslíkových radikálů, vychází toto ovoce jako nejsilnější [1]. Zheng a kol. [28] stanovili antioxidační hodnotu metodou ORAC na 160,2 $\mu\text{mol TE/g}$, k podobné hodnotě se dostali Wu a kol. [29] – 161 $\mu\text{mol TE/g FW}$. Ti ve své studii porovnávali několik bobulí, z nichž aronie vyšla jako neaktivnější, například v angreštu byla absorbanční kapacita kyslíkového radikálu pouze 21 $\mu\text{mol TE/g FW}$. Další bobule analyzovali Moyer a kol. [30] a ti v ostružině a černém rybízu naměřili kolem 56 $\mu\text{mol TE/g}$.

2.3.2. Preventivní účinek bioaktivních látek aronie

Kardiovaskulární choroby a zvýšený cholesterol

Ateroskleróza je chronická zánětlivá choroba cév, která může způsobit vážné kardiovaskulární problémy. Vyskytuje se u lidí s vysokým cholesterolem, vysokým krevním tlakem, obezitou či jinými rizikovými faktory. Kromě přímého působení polyfenolů na zdraví cév (vasoaktivní a vasoprotektivní účinek) je pozitivní účinek pozorován také na obsahu cholesterolu v krvi. Polyfenoly jsou schopnými inhibitory oxidace LDL cholesterolu, tato oxidace je považována za klíčový mechanismus pro vyvolání aterosklerózy. Také celkový obsah triacylglycerolů je snižován, ale na druhou stranu pokles obsahu HDL cholesterolu nebyl pozorován [2] [15] [18]. Pozitivní účinek na kardiovaskulární systém člověka byl doložen v mnoha publikacích, například Skoczyńska a kol. [31] pozorovali, že po šestitýdenním podávání (experiment prováděli ve 3 kolech, každý po 6 týdnech s 6 týdenní pauzou a významné pozitivní změny zaznamenali v druhém kole) aroniové šťávy (250 ml denně) se u mužů s lehce zvýšeným cholesterolem výrazně snížil celkový cholesterol v séru, LDL cholesterol a úroveň triacylglycerolů, přičemž se hladina cholesterolu HDL2 zvýšila. Navíc zaznamenali snížení glukózy v krvi, koncentrace fibrinogenu a homocysteinu. Snížení fibrinogenu a homocysteinu a současně zvýšení cholesterolové frakce HDL2 může navíc podporovat antitrombotické účinky [31].

Antimutagenní a antirakovinná aktivita

Jednou z nejzákeřnějších civilizačních chorob je rakovinné bujení. Jeho léčba je velmi invazivní, náročná pro organismus a zároveň velmi nákladná. Proto je důležité najít alternativní léčbu jako doplněk té klasické, a navíc i podpořit samotnou prevenci. Antokyaniny, díky vysoké zhášecí aktivitě volných radikálů, významně snižují mutagenní procesy v buňce a k tomu i inhibují promutagenní enzymy [1]. Výzkumem účinku aronie proti rakovinnému bujení v tlustém střevě se zabývá mnoho vědeckých skupin, jako například Malik a kol. [32], kteří pozorovali inhibici růstu a zároveň stimulaci apoptózy rakovinných buněk tlustého střeva. Tento inhibiční efekt, ale nepůsobil na zdravé buňky tlustého střeva

[32]. Jing a kol. [33] se zaměřili na vztah mezi strukturou antokyanů a schopností inhibice růstu rakovinných buněk u několika druhů ovoce. Aronie vyšla aktivnější než fialová mrkev, hroznové víno, ředkev a černý bez, a jako významně antikarcinogenní se ukázaly neacetylované monoglykosylované antokyany [33].

Antimikrobiální aktivita

Kromě antioxidačního efektu mají fenolické sloučeniny, vyskytující se v aroniových extraktech, také antibakteriální účinek. Při *in vitro* zkouškách působily extrakty aronie podle Valcheva-Kuzmanova a Belcheva [34] bakteriostaticky na *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*. Toto jsou běžné lidské patogeny, zejména *S. aureus*, který může způsobovat vleklé zdravotní problémy a kvůli resistenci na antibiotika je čím dál těžší ho z organismu odstranit. *E. coli* se přirozeně vyskytuje v mikroflóře tlustého střeva, ale při orálním podání může způsobovat alimentární onemocnění [1].

2.4. Využití plodů aronie

Aronii lze uvést jako příklad takzvané „super potraviny“, respektive ovoce. Toto je neoficiální skupina potravin, která vznikla primárně jako marketingový tah, při popularizaci zdravého životního stylu. To, co jednotlivé potraviny spojuje, je vysoká nutriční hodnota, vysoký podíl minerálů a vitaminů a specifická bioaktivní vlastnost. Jako další super ovoce se například zmiňuje brusnice (*Vaccinium angustifolium*), kustovnice (*Lycium barbarum* L.), klikva (*Vaccinium macrocarpon*), acai (*Euterpe oleracea*) a další [4].

Nejčastějšími produkty z aronie jsou šťávy, koncentráty, džemy, želé, čaj a víno. Kvůli jejich výrazné chuti se šťáva často míchá s jinými, aby se docílilo mnohem příjemnější chuti, například s čerstvým jablečným džusem. Z čerstvých bobulí se lisováním získávají potravinářská barviva [4].

Původně bylo zintenzivnění produkce aronie podníceno poptávkou po přírodních potravinářských barvivech [2]. V rámci snahy o zpracování vedlejších produktů se zjistilo, že metanolové extrakty z mrazem sušených výlisků dokonce dosahovaly vyšší schopnosti eliminace kyslíkových radikálů, než metanolové extrakty lyofilizovaných bobulí. Díky tomuto se z odpadního produktu – výlisků, může vytvořit cenný zdroj antokyanů [1] [21].



Obrázek 4 Výrobky z aronie firmy LEROS [70] [71].

2.5. Nežádoucí účinky aronie

Kromě vysokého obsahu fenolických látek a antokyanů, které jsou žádoucími sloučeninami, obsahují aroniové bobule amygdalin. Amygdalin je kyanogenní sloučenina, význačná hořce-mandlovou chutí, ze které může za určitých podmínek vzniknout kyanovodík. Kyanovodík je vysoce těkavý (teplotu varu má lehce nad pokojovou teplotou) a vysoce toxický (nejnižší pozorovaný smrtelný obsah byl stanoven na méně než $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ u dospělého člověka). Obsah amygdalinu je $20,1\text{ mg}/100\text{ g FW}$, $5,7\text{ mg}/100\text{ ml}$ ve šťávě a v čerstvých výliscích je možno stanovit až $52,3\text{ mg}/100\text{ g}$ [2].

Jinými možnými nepříznivými účinky jsou například laxativní problémy kvůli vysokému obsahu sorbitolu a případně zhoršené vstřebávání minerálů jako je zinek, měď a železo, které by mohlo způsobit až deficit minerálů a anémii. Tento jev nastává z důvodu vysokého obsahu polyfenolických sloučenin, které jsou v nižším množství naopak velmi žádoucí [4].

2.6. Metody vhodné pro extrakci účinných látek z aronie

Z předchozího textu tedy vyplývá, že přírodní bioaktivní látky jsou velmi perspektivní a způsob jejich získávání je základem pro výslednou kvalitu i kvantitu extraktu. Typ extrakce se vybírá s ohledem hlavně na typ matrice a chemickou povahu aktivní látky. Dalšími faktory, které nejvýznamněji ovlivňují extrakci, jsou rozpouštědlo, teplota, čas a tlak [16] [35]. Způsoby získávání bioaktivních extraktů z ovoce a bylin se dělí na konvenční a nekonvenční. Ty klasické, konvenční, jsou založeny na starých postupech, které vyžadují velké objemy organických rozpouštědel, vysokou spotřebu energie a dlouhý čas extrakce. Mezi konvenční

techniky se řadí například extrakce podle Soxhleta, která se stále používá jako referenční technika pro rozvíjející se moderní nekonvenční techniky.

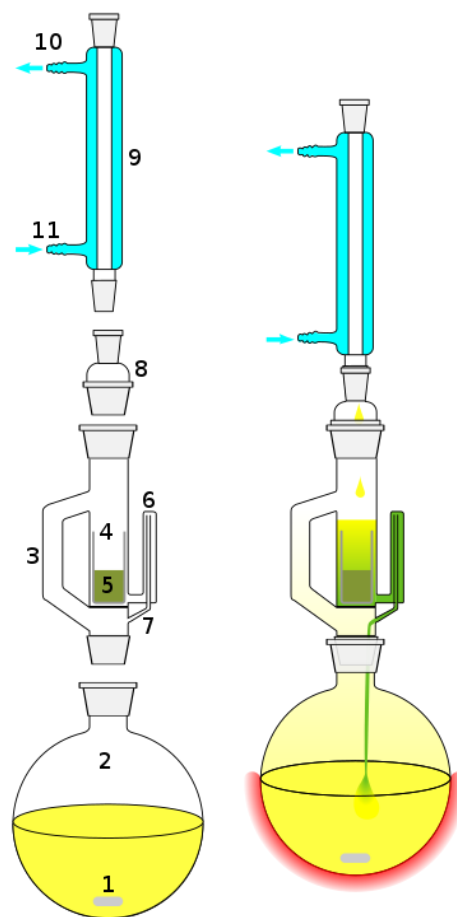
Nekonvenční metody se začaly rozvíjet asi před 50 lety, jejich výhody leží nesporně ve zkrácení doby extrakce, nižší spotřebě organických a syntetických chemikálií a vyšších a kvalitnějších výtěžcích [16]. Jsou šetrnější jak k extrahovaným sloučeninám, tak k životnímu prostředí. Nicméně i tyto techniky mají své nevýhody a omezení jak v laboratorních, tak průmyslových podmínkách, a proto se neustále optimalizují jejich postupy.

2.6.1. Konvenční techniky

Základem konvenčních technik je síla rozpouštědel, působení tepla a míchání. K získání bioaktivních komponent jsou tradičními technikami extrakce podle Soxhleta, macerace a hydrodestilace [16].

2.6.1.1. Extrakce podle Soxhleta

Tato technika byla původně navržena v roce 1879 F. R. von Soxhletem pro extrakci lipidů. Od té doby se začala používat i na extrakci bioaktivních látek z různých přírodních zdrojů. Extrakce podle Soxhleta je zobrazena na následujícím obrázku (Obrázek 5). Malé množství vzorku (5) se umístí do extrakční patrony (4), která se připojí nad varnou baňku (2) s rozpouštědlem a míchadlem (1). Rozpouštědlo je odpařováno z baňky a kondenzuje v patroně se vzorkem, kondenzované rozpouštědlo je odváděno do sifonu (6). Potom co se sifon přeplní, rozpouštědlo se vzorkem se vrací do destilační baňky. Proces se opakuje, dokud nedojde ke kompletní extrakci žádaných látek do rozpouštědla [16] [36]. Výhodou Soxhletovy extrakce je potřeba malého množství rozpouštědla. To ale musí dosahovat vysoké čistoty (vysoká cena), rozpouštědla jsou hořlavá a mohou být toxická. Proto se nedá zařadit k „zeleným“ metodám. Samotný vzorek je omezen tím, že musí být suchý a nejmenno namletý [37] [38].



Obrázek 5 Schéma extrakce podle Soxhleta, 1: míchadlo, 2: varná baňka, 3: destilační cesta par, 4: extrakční patrona, 5: pevný vzorek, 6: sifon, 7: odtok sifonu, 8: přechodová vložka, 9: kondenzátor, 10: výstup chladicí vody, 11: vstup chladicí vody [72].

2.6.1.2. Macerace

Nejjednodušší extrakční technikou je macerace. Její podstatou je luhovalání pevného surového materiálu ve vodě nebo rozpouštědle po určitou dobu. Tato doba zpravidla musí být dlouhá – v řádu hodin až dní. Prvním krokem je příprava vzorku, ten se musí nadrtit/nasekat/namlít, aby se zvýšil povrch vzorku pro extrakci. Dále následuje vlastní extrakce ve správně zvoleném rozpouštědle – to má na povahu vyextrahované látky zásadní vliv. V průběhu extrakce se vzorek může občas promíchat, aby se zvýšila účinnost – podpoří se difuze a zároveň se nasycené rozpouštědlo oddělí od povrchu vzorku a promíchá se s nenasyceným. Po uplynutí doby extrakce se vyluhovaný vzorek od rozpouštědla oddělí filtrací, nejčastěji za sníženého tlaku [16] [37]. Výhodou této metody je její jednoduchost, dá se snadno modifikovat pomocí změny teploty, navážky, rozpouštědla. Stále je zapotřebí velké množství organických rozpouštědel a samotného materiálu [37].

2.6.1.3. Hydrodestilace

Další konvenční technikou pro extrakci bioaktivních látek a esenciálních olejů je hydrodestilace. Jak už napovídá její název, jde o destilaci vodou, má však další dvě

modifikace – destilace vodní parou a vodou a přímá destilace vodní parou. Proces destilace vodou probíhá obdobně jako při Soxhletově extrakci. Vzorek je spolu s vodou zahříván k varu, vodní pára obsahující extrahované látky kondenzuje v chladiči, ze kterého se esenciální oleje sbírají ve sběrné nádobě. Při hydrodestilaci probíhají tyto tři fyzikálně-chemické procesy: hydrodifuze, hydrolýza a rozklad teplem. Při vyšších teplotách může docházet ke ztrátám těkavých látek v termolabilních vzorcích. Naopak výhodou je použití levného a „zeleného“ rozpouštědla – vody [16] [39] [40].

2.6.2. Moderní techniky

Jako tzv. „zelené“ metody získávání bioaktivních látek z přírodních materiálů se používají například tyto techniky: ultrazvuk, pulzní elektrické pole, mikrovlnný ohřev a extrakce superkritickými kapalinami [16] [25].

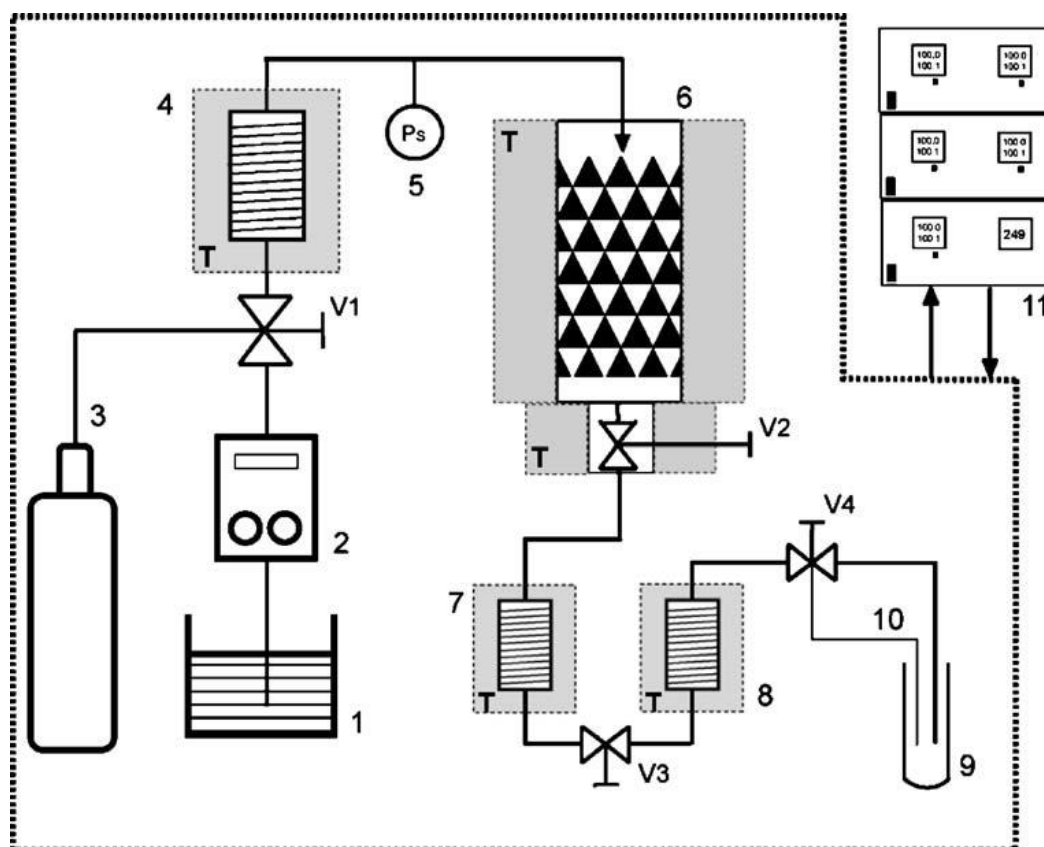
2.6.2.1. Extrakce stlačenou vodou

V této práci byla jako nekonvenční metoda použita extrakce kapalnou stlačenou vodou, PHWE (Pressurized Hot Water Extraction). Pro tuto techniku se používají i názvy Subcritical Water Extraction (SWE), Pressurized Liquid Extraction (PLE) [41]. Při všeobecné snaze snížit spotřebu organických rozpouštědel, se použití pouze čisté vody zdá jako „jasná volba“. Samozřejmě je nutné vzít v úvahu, že použití organických rozpouštědel má své opodstatnění. Jsou potřeba na to, aby se všechny extrahovatelné látky ze vzorku opravdu získaly. Těchto vlastností voda za normálních podmínek nedosahuje, a proto se využívá přetlaku a vysoké teploty. Tyto podmínky jsou nastaveny nad atmosférický bod varu vody a pod její kritický bod [41]. Voda jako chemická látka má velmi specifické vlastnosti, které z ní dělají naprosto jedinečnou a nenahraditelnou látku. Ve stručnosti jsou těmito charakteristikami například vodíkové můstky, specifická tepelná kapacita a další. V případě, že se voda dostane do vysokých teplot za kontrolovaného přetlaku, její polarita se přiblíží polaritě alkoholových rozpouštědel. To v praxi znamená, že dokáže rozpouštět velký rozsah látek se střední a nízkou polaritou [16] [41] [42] [43].

Pro extrakci antokyaninů použili Arapitsas a Turner [44] PHWE na rostlině *Beassica oleracea*, hroznová semínka byla extrahována pro stanovení katechinu a proantokyaninu skupinou Marino a kol. [45]. Dále PHWE využili Pineiro a kol. [46], kteří stanovili obsah katechinů a epikatechinů v čajových lístcích a v hroznových semíncích a Kim a kol. [47], kteří stanovili celkový obsah fenolických látek ve výliscích z citrusů.

Aplikace PHWE na aronii dosud nebyla publikována; v experimentu Brazdauskas a kol. [48] byly bioaktivní látky aronie extrahovány pomocí PLE, kteří tuto metodu navrhli jako novou alternativu zpracování výlisků aronie po superkritické fluidní extrakci. Pro návrh experimentu použili experimentální design se 3 proměnnými – teplotou, koncentrací etanolu a kyseliny mravenčí. Sledované výstupy byly celkový obsah polyfenolů a celková antioxidační kapacita. Jako optimální podmínky stanovili 46% etanol s 1,86 % kyseliny mravenčí a při teplotě 165 °C. Díky tomuto postupu došli k celkovému obsahu polyfenolů v extraktu 236,6 mg GAE·g⁻¹ s antioxidační aktivitou 4,35 mmol TE·g⁻¹.

Extrakční mechanismus PHWE probíhá v přibližně čtyřech po sobě jdoucích krocích. Celá extrakce probíhá v extrakční patroně naplněné vzorkem a pískem (balotinou) o definované velikosti částic. Prvním krokem je desorpce rozpustných látek z aktivních míst matrice vlivem zvýšené teploty a tlaku. Druhým krokem může být difuze rozpouštědla do matrice vzorku, ze které se následně uvolní rozpouštěné látky do rozpouštědla. Posledním krokem je převedení vyextrahovaných látek z patrony do sběrné vialky [41].



Obrázek 6 Schéma aparatury pro PFE a PHWE. 1 zásobník extrahovadla, 2 HPLC pumpa, 3 dusík, 4 předehřivací jednotka, 5 tlakový senzor, 6 extrakční nádoba v termostatu, 7 a 8 termostatické dekompresní komory, 9 sběrná vialka, 10 restriktor, 11 kontrolní jednotky [74].

2.6.2.2. Ultrazvuková extrakce

Kromě extrakcí natlakovaným rozpouštědlem je oblíbenou metodou využití ultrazvuku (UAE – Ultrasound Assisted Extraction). Ultrazvuk je oblast zvukových vln v rozmezí 20 kHz až 100 MHz a lidské ucho tyto vlny nedokáže zachytit. Podstata extrakce ultrazvukem spočívá ve schopnosti vln procházet médiem. Při průchodu způsobí stahování a následné roztahování a tento efekt způsobuje kavitaci. Kavitace znamená tvoření bublin, které následně rostou a praskají. Při prasknutí působí na materiál nejen zvýšenou teplotou, ale i tlakem. Ultrazvukové vlny navíc způsobují mechanické narušení rostlinné matrice – rozpouštědlo snáze penetruje. Výhodou ultrazvukové metody je kratší doba extrakce, nižší nároky na energii a objem rozpouštědla. Navíc dochází k lepšímu promíchávání a rychlejšímu přenosu

hmoty. Nevýhodou může být, že kvůli vysoké teplotě v bublinách, dojde k degradaci termolabilních sloučenin [16] [21] [43] .

UAE bylo pro extrakci aronie využito ve studii Ramić a kol. [21], ti ji použili v rámci experimentu, který měl za úkol optimalizovat extrakci polyfenolů z vedlejších produktů výroby aroniového čaje. Ultrazvuk využili, aby zvýšili účinnost extrakce, protože konvenční metody založené na extrakci látek do rozpouštědla považují za neefektivní. Pro optimalizaci využili faktoriálního designu a jako faktor s největším vlivem byla určena teplota, kterou jako optimální stanovili na 70 °C.

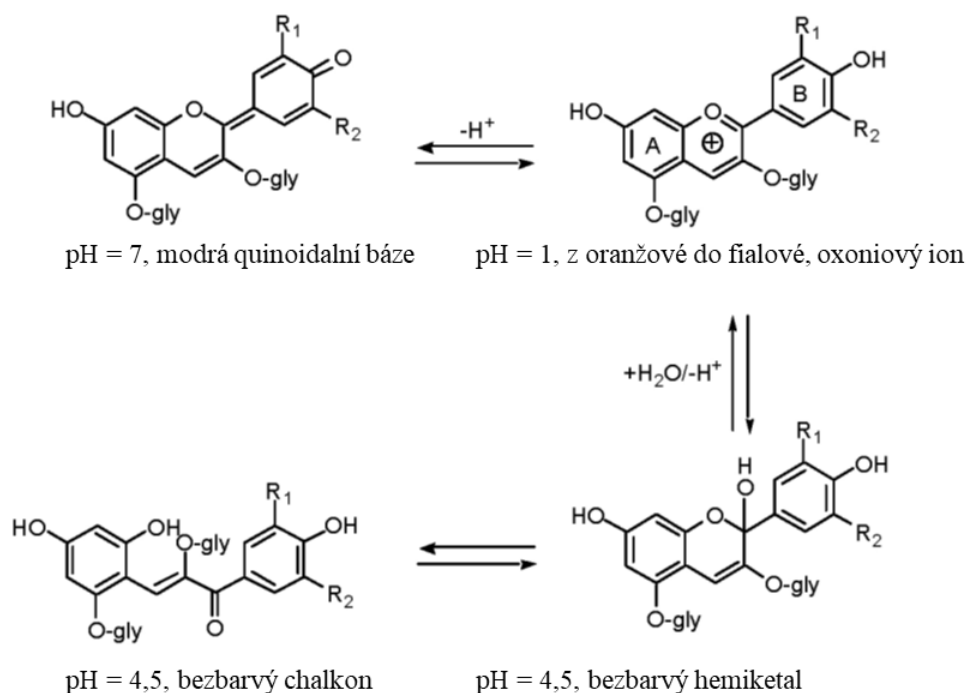
2.7. Metody vhodné pro stanovení bioaktivních látek v aronii

2.7.1. Celkový obsah fenolů

Stanovení celkových polyfenolů podle Folin-Ciocalteua je jednou z nejrozšířenějších a nejoblíbenějších analytických technik. Je to kolorimetrická metoda, jejímž principem je přenos elektronu mezi Folin-Ciocalteovým (F-C) činidlem a fenolickou sloučeninou [49]. F-C činidlo je založeno na směsi molybdenanu a wolframanu sodného a samotná metoda probíhá v silně alkalickém prostředí uhličitanu sodného (okolo pH 10). Výsledný barevný komplex je modrý a jeho přesný vzorec není kvůli své složitosti zcela jasný [49]. Předpokládá se, že reakce je soustavou jedné nebo dvou redukčních reakcí, ve kterých přenos elektronů probíhá mezi redukujícím činidlem a molybdenanem. Zásadité prostředí je potřeba k tomu, aby se vytvořil fenolický ion, který poté redukuje F-C činidlo [49]. Jako standard se pro tuto metodu používá kyselina gallová a výsledný celkový obsah polyfenolů se vyjadřuje jako ekvivalent kyseliny gallové (Gallic Acid Equivalent – GAE). Metodika použitá v této práci je popsána v experimentální části.

2.7.2. Celkový obsah antokyanových barviv

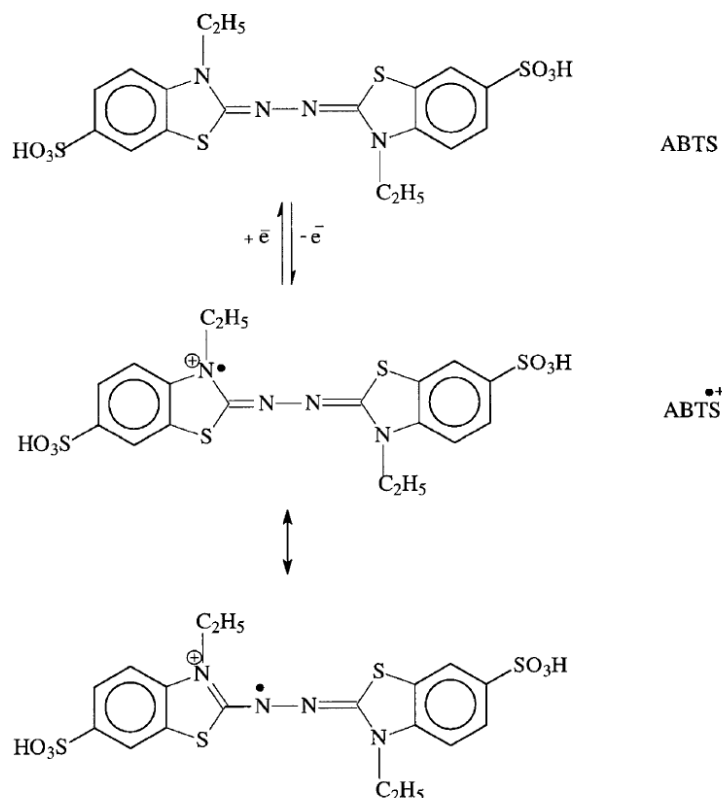
Pro stanovení celkových antokyanů ve vzorku se nejčastěji používá pH diferenciální metoda. Je založena na UV-VIS spektrofotometrii a strukturálních změnách, ke kterým dochází při změně pH. Při změně pH zároveň dochází k vratné změně barvy, při pH 1,0 je oxoniový ion barevný a při pH 4,5 se mění na bezbarvý hemiketal. Rozdíl absorbancí při 520 nm je přímo úměrný koncentraci pigmentu. Výsledná koncentrace se vyjadřuje jako ekvivalent kyanidin-3-glukosidu. Degradované antokyaniny v polymerní formě jsou vůči změně barvy změnou pH rezistentní, do výsledné koncentrace se ale nezapočítávají, protože absorbují při obou hodnotách pH [50].



Obrázek 7 Reakce probíhající při pH diferenciální metodě [47]

2.7.3. Stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS^{•+}

Nejčastějšími metodami pro určení antioxidační aktivity jsou ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), a ABTS*. V této práci byla antioxidační aktivita stanovena pomocí metody používající ABTS (označována také jako metoda TEAC) [51]. ABTS je zkratka pro 2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát) (viz Obrázek 8) a jako TEAC se také nazývá podle Trolox Equivalent Antioxidant Capacity – protože výsledná antioxidační aktivita se vyjadřuje jako ekvivalent Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2- karboxylová kyselina). Jde tedy o schopnost vzorku zhaset radikál ABTS^{•+}. Ten se připravuje oxidací ABTS peroxylovým radikálem (např. peroxidisíran draselný nebo oxidem manganičitým) na ABTS^{•+}. Tento radikál je intenzivně zbarvený, po reakci s antioxidanty ve vzorku se tato intenzita snižuje a podle toho se poté určí ekvivalent Troloxu v $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Absorbance se měří pomocí UV/VIS spektrofotometru při vlnové délce 734 nm. Výhodou této metody je její jednoduchost a rychlost, samotné měření trvá maximálně 30 minut pro jeden vzorek a dá se využít v širokém rozpětí pH. Navíc je ABTS^{•+} rozpustné jak ve vodných, tak organických rozpouštědlech a není ovlivněno iontovou silou, může být použito pro hydrofilní i lipofilní vzorky. Jediným omezením je krok přípravy samotného radikálu, například při využití peroxidu je nutné nechat reakci proběhnout po dobu alespoň 16 hodin [51] [52].



Obrázek 8 Struktura ABTS a ABTS^{•+} [73]

2.7.4. UV-VIS spektrofotometrie

UV-VIS spektrofotometrie je základní technikou pro stanovení bioaktivních látek aronie, v této práci byla aplikována v rámci všech tří výše uvedených stanovení (kap. 1.7.1-1.7.3). UV-VIS spektrometrie je založena na absorpci elektromagnetického záření v oblasti UV/VIS. Tato oblast je ohraničena vlnovými délkami 200-400 nm pro ultrafialovou (UV) oblast a 400-800 nm pro viditelnou oblast (VIS). V těchto oblastech je absorbovaná energie dostatečná pro přechody π nebo nevazebných elektronů mezi energetickými hladinami [53] [54]. Koncentrace látky schopné absorbovat záření je pak úměrná absorbanci podle Lambert-Beerova zákona:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l, \quad (1)$$

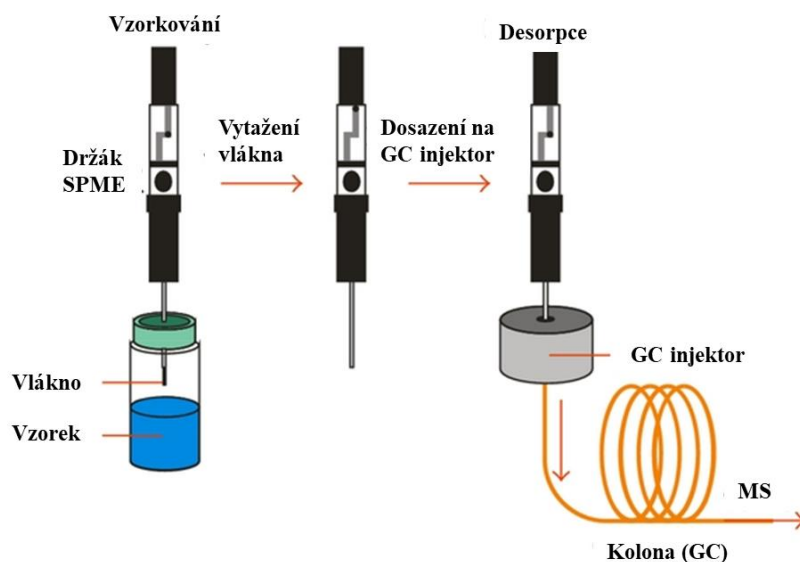
kde A je naměřená absorbance, ε – molární absorpční koeficient, c – koncentrace, l – délka květy.

2.7.5. Stanovení těkavých látek

Pro stanovení těkavých látek v extraktu aronie byla použita kombinace instrumentálních technik SPME-GC-MS (viz Obrázek 9 a Obrázek 10).

Mikroextrakce tuhou fází (SPME – Solid-Phase Microextraction) je velmi efektivní vzorkovací metodou, které nevyužívá rozpouštědla a v jednom kroku kombinuje vzorkování, extrakci, předkoncentrování a injekci vzorku do analytického přístroje [55]. Je založena na extrakci pomocí vlákna potaženého čistým polymerem nebo adsorpčními částicemi. Těmito

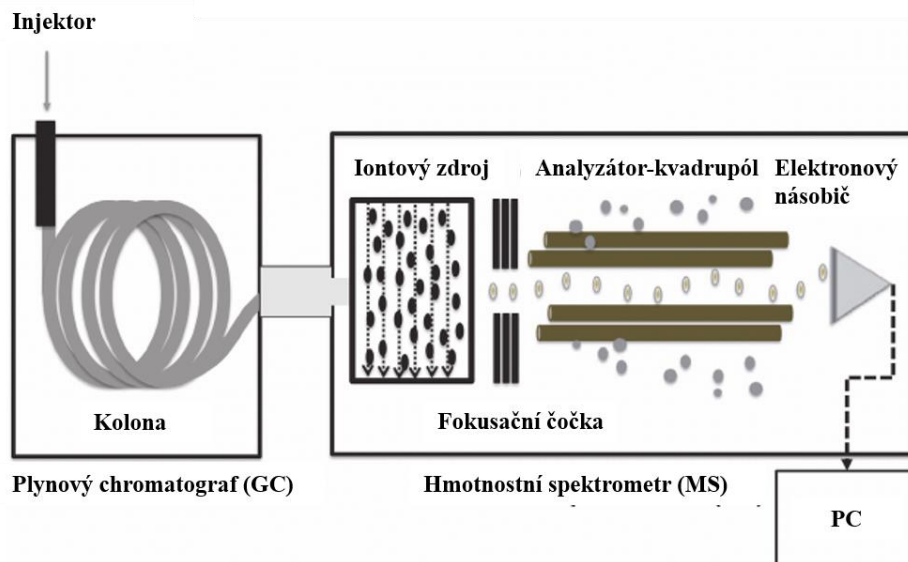
polymery jsou pro nepolární sloučeniny polydimethylsiloxany (PDMS) a pro polární polyakrylát (PA) nebo polyetylen glykol (CARBOWAX™). Adsorbční částice jsou pórovité a tvoří je například směs Carboxen®/PDMS, nebo PDMS/divynylbenzen (DVB) [56]. Vzorek může být jak v kapalném, tak i plynném a pevném skupenství, velkou výhodou této extrakční techniky je, že nedochází k destrukci vzorku. Proces probíhá ve dvou krocích – adsorpce a následná desorpce sloučenin s afinitou k vláknu [55]. Následně je možné vzorek zhodnotit jak kvantitativně, tak kvalitativně [55].



Obrázek 9 Schéma propojení SPME s GC-MS (upraveno podle [76]).

Po extrakci vzorku z vialky pomocí SPME v headspace módu (HS), byly vzorky dále analyzovány pomocí plynové chromatografie (GC) s hmotnostním spektrometrem (MS). Plynová chromatografie je separační a analytická instrumentální technika založená na dělení složek mezi stacionární a mobilní fází. Separované sloučeniny jsou z kolony eluovány mobilní fází v různých (jim vlastních) retenčních časech. V případě plynové chromatografie je stacionární fáze kapalná nebo pevná. Plynový chromatograf se skládá ze systému nosného plynu, injektoru, chromatografické kolony, detektoru a vyhodnocovacího zařízení. Velkou výhodou této metody je potřeba velmi malého množství vzorku, anebo ve velmi malé koncentraci. Na druhou stranu, mnoho sloučenin není termostabilních, a tudíž nemohou být pomocí GC stanoveny [57].

Pro identifikaci sloučenin rozdělených chromatografií se používá hmotnostní spektrometrie. Sloučenina je ionizována a fragmentována, nabitě částice jsou pak rozděleny na základně fyzikální separace iontů podle poměru hmotnosti k náboji (m/z) [58]. Výstupem MS je hmotnostní spektrum, které s vysokou přesností určuje danou sloučeninu. Kombinace GC-MS je ideální v tom, že látky jsou rozděleny pomocí GC a následně jedna po druhé analyzovány a porovnány s knihovnou spekter. Spektrometr se skládá z iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru. Iontovým zdrojem může být elektrosprej (ESI), indukčně vázané plazma (ICP), chemická (CI) nebo elektronová ionizace (EI). Hmotnostní analyzátoři jsou například čas letu (TOF), kvadrupól, iontová past a další [59].



Obrázek 10 Schéma spojení GC-MS s kvadrupólovým analyzátozem (upraveno podle [75]).

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Laboratorní vybavení

- Elektrický mlýnek (Bosch, Německo)
- Spektrofotometr (Helios Gamma & Delta Spectronic Unicam, USA)
- Analytické digitální váhy (GR-202-EC, HELAGO, Itálie)
- Vodní lázeň (Julabo TW 2, Německo)
- Plynový chromatograf Trace TM 1310 se split/splitless injektorem, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
- Hmotnostní detektor ISQTM LT Single Quadrupole, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
- Knihovna spekter NIST/EPA/NIH, Gaithersburg, Maryland, USA
- Vyhodnocovací systém Xcalibur 2.2 (Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- PFE extrakční aparatura Ústavu analytické chemie AVČR v Brně
- Běžné laboratorní vybavení a sklo

Chemikálie

- Etanol 96 % p.a. (Penta)
- Folin-Ciocalteho činidlo (Sigma – Aldrich, USA)
- Uhlíčitan sodný (Lachema, ČR)
- Kyselina gallová (Sigma – Aldrich, USA)
- ABTS (Sigma-Aldrich, USA)

3.2. Analyzované vzorky

Aronie byla zakoupena v běžné tržní síti jako sušené plody (firma Bylinné čaje [60]) a před extrakcí byly plody namlety elektrickým mlýnkem na jemnou drť. Na Obrázek 11 je vyfocena etiketa obalu, ve kterém byly sušené plody aronie zabaleny.



Obrázek 11 Zakoupené balení aronie

3.3. Získ extraktů aronie

Pro získání extraktů aronie v rámci této práce byly použity a porovnány macerace a PHWE. Optimalizace těchto postupů je hlavním cílem práce a bude podrobněji popsána ve výsledkové části práce.

3.3.1. Extrakce/macerace

Do Erlenmeyrovky bylo vždy naváženo dané množství namletého vzorku a doplněno na objem 50 ml rozpouštědlem (voda/etanol). Extrakce/macerace probíhala ve vodní lázni při zvolené teplotě, po uplynutí doby extrakce byl obsah kvantitativně převeden na Büchnerovu nálevku a zfiltrován za nízkého tlaku (viz Obrázek 12). Jako rychlá metoda stanovení efektivity extrakce bylo vybráno stanovení celkových polyfenolů podle Folin-Ciocalteu (F-C), metoda je popsána dále. Všechna stanovení byla prováděna paralelně. Získané filtráty byly uchovány v mrazničce. Pro optimalizaci macerace byla aplikována statistická metoda Design of Experiment (DOE) (viz kap. 4.1.2).



Obrázek 12 Drcená aronie po extrakci a filtraci (vlevo) a výsledný filtrát po extrakci

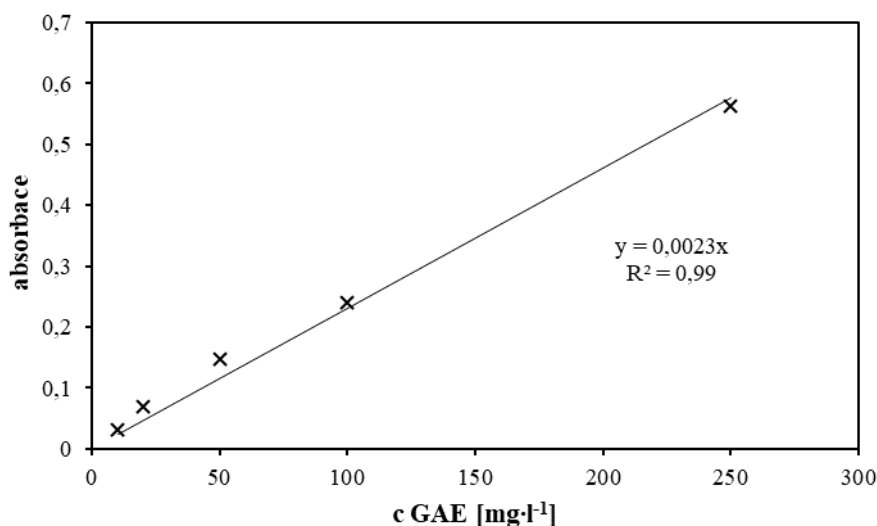
3.3.2. Extrakce horkou vodou

Vzorek byl pro přetlakovou extrakci připravován následovně. Do 11 ml patrony byl navážen vzorek a skelný písek (o průměru 600-800 μm) v poměru 1:10. Všechny vzorky byly extrahovány pod tlakem 15 MPa. Do patrony bylo kvantitativně převedeno dané množství vzorku smíchaného se skelným pískem (balotinou, aby výsledná navážka byla 10 g) a patrona byla upevněna do přístroje. Následovalo tlakování přístroje, poté 5minutová extrakce a vypuštění extraktu. Po samotné extrakci je potřeba přístroj propláchnout před dalším vzorkem 1 ml vody. Pro optimalizaci extrakce bylo opět použito stanovení celkových polyfenolů podle F-C a těkavých látek pomocí HS-SPME-GC-MS.

3.4. Použité metody stanovení jednotlivých charakteristik

3.4.1. Stanovení celkového obsahu fenolů podle Folin-Ciocalteua

Nejprve byly připraveny čerstvé roztoky nasyceného uhličitanu sodného (7,5 g na 100 ml) a Folin-Ciocalteua (zředěn v poměru 1:9). Do zkumavek byl postupně přidán 1 ml destilované vody, 100 μl vzorku a 1 ml Folin-Ciocalteova roztoku. Zkumavky byly promíchány na vortexu a po 5 minutách stání se do každé přidal 1 ml roztoku uhličitanu sodného. Zkumavky byly opět promíchány a poté byly ponechány ve tmě na nejméně 45 minut. Veškeré vzorky aroniového extraktu byly ředěny 100x, a měřeny při vlnové délce 750 nm proti slepému vzorku. Výsledná koncentrace celkových fenolických látek byla vypočítána jako ekvivalent kyseliny gallové v mg na 100 gramů DW ($\text{mg}_{\text{GAE}}/100 \text{ g DW}$). Kalibrační křivka byla sestrojena v rozmezí 10-250 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ kyseliny gallové a výsledná křivka a rovnice použitá pro výpočet je zaznamenána v Graf 1.



Graf 1 Kalibrační křivka kyseliny gallové

3.4.2. Stanovení obsahu antokyanových barviv pH diferenciální metodou

3.4.2.1. Příprava tlumivých roztoků

Pufr o pH 1 a koncentraci $0,025 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ chloridu draselného byl připraven v objemu 200 ml navážením 0,372 g chloridu draselného na analytických vahách a rozpuštěním ve 190 ml destilované vody v kádince. Kádinka s roztokem byla míchána na magnetické míchačce a zároveň do ní byla zavedena kombinovaná elektroda. Pomocí koncentrované kyseliny chlorovodíkové bylo pH upraveno na hodnotu 1. Roztok byl poté převeden do 200 ml odměrné baňky a doplněn po rysku.

Pufr o pH 4,5 a koncentraci $0,4 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ octanu sodného byl připraven obdobně jako předchozí tlumivý roztok. Navážka octanu draselného byla 10,886 g a po upravení pH na hodnotu 4,5 byl roztok doplněn po rysku v 200 ml odměrné baňce.

3.4.2.2. Samotné měření a výpočet koncentrace

Do zkumavek bylo napipetováno 2,5 ml tlumivého roztoku chloridu draselného a 0,5 ml vzorku, do dalších zkumavek bylo napipetováno stejné množství roztoku octanu sodného a vzorku. Zkumavky byly poté zamíchány na vortexu a každá zkumavka byla následně přeměřena při vlnové délce 510 nm a 700 nm.

Koncentrace antokyanových barviv se stanoví podle následujícího vzorce jako ekvivalent kyanidin-3-glukosidu (CGE):

$$c_{MP} = \frac{A \cdot M \cdot F \cdot 1000}{\varepsilon \cdot l}, \quad (2)$$

kde celková absorbance je dána vztahem:

$$A = (A_{510} - A_{700})_{pH 1} - (A_{510} - A_{700})_{pH 4,5}, \quad (3)$$

c_{MP} – výsledná koncentrace monomerního pigmentu [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]

A – celková absorbance

F – faktor ředění

M – molekulová hmotnost pigmentu kyanidin-3-glukosidu [$449,2 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$]

l – délka kyvety [cm]

ε – molární absorpční koeficient pro kyanidin-3-glukosid [$26\,900 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]

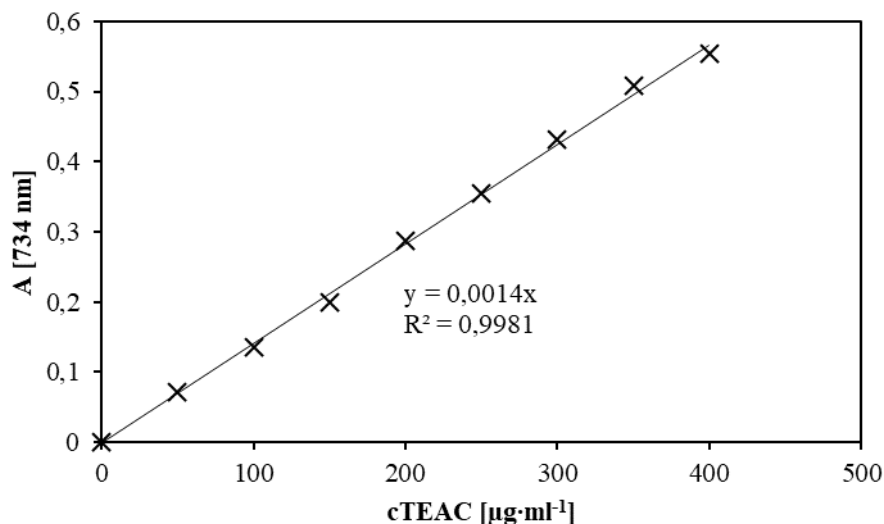
3.4.3. Stanovení celkové antioxidační aktivity pomocí ABTS* radikálu

Radikál ABTS** byl připraven rozpuštěním ve vodě s peroxidem. Roztok byl přes noc ponechán ve tmě při pokojové teplotě a samotné měření vzorků bylo provedeno druhý den. Roztok radikálu ABTS** byl naředěn 60% etanolem na absorbanci $0,7 \pm 0,02$ při vlnové délce 734 nm. 1 ml takto zředěného roztoku byl v kyvetě smíchán s 10 μl destilované vody a na spektrofotometru byl změřen čas $t=0$. Pro stanovení antioxidační kapacity vzorku byl do kyvety napipetován 1 ml ABTS a 10 μl . Obsah byl promíchán a na 10 minut odložen do tmy. Po 10 minutách byla změřena absorbance $t=10$.

Výsledná absorbance byla stanovena jako:

$$A = A_0 - A_{10}, \quad (4)$$

a dosazena do kalibrační křivky, která byla sestrojena v rozmezí koncentrací $50\text{-}400 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Troloxu rozpuštěného v 60% etanolu. Výsledná koncentrace pak byla stanovena jako ekvivalentní množství Troloxu $c_{TEAC} \cdot \text{ml}^{-1}$. Kalibrační křivka je znázorněna v Graf 2.



Graf 2 Kalibrační křivka Troloxu

3.4.4. Stanovení těkavých látek

Pro stanovení těkavých látek byla použita metoda HS-SPME-GC-MS. Do vialky (o objemu 4 ml) bylo naváženo 0,5 g sušené aronie a při analýze extraktů byly do vialky napipetovány 3 ml vzorku.

Vialky byly uzavřeny šroubovacím uzávěrem se vzduchotěsným kaučuk-teflonovým septem. Poté byly postaveny do držáku a analýza byla spuštěna programem Xcalibur 2.2, parametry analýzy jsou uvedeny v Tabulka 2. K identifikaci látek byly použity knihovny hmotnostních spekter NIST/EPA/NIH Gaithesburg, Maryland, USA a interní knihovna se standardy alergenních látek. Obsah látek identifikovaných v bobulích a extraktech byl vyjádřen semikvantitativně na základě plochy píků.

Tabulka 2 Nastavení SPME podmínek HS-SPME-GC-MS analýzy

Podmínky HS- extrakce	
Doba inkubace (temperace)	10 minut
Teplota extrakce a inkubace (teplota agitátoru)	40 °C
Agitátor zapnutý	5 sekund
Agitátor vypnutý	60 sekund
Podmínky GC–MS analýzy	
Kapilární kolona	TG-WaxMS
Rozměry kolony	30 m x 0,25 mm x 0,5 μm
Teplota injektoru (desorpce)	240 °C
Doba desorpce	20 minut
<i>Dávkování splitless, ventil uzavřený 10 minut</i>	
Nosný plyn	hélium
Průtok nosného plynu	1 ml·min ⁻¹

Podmínky GC–MS analýzy

Teplotní program	40 °C po dobu 1 min., vzestupný gradient 5 °C·min ⁻¹ do 220 °C po dobu 22 minut
Celková doba analýzy	60 minut
<i>Hmotnostní detektor v módu EI</i>	
Energie ionizačních elektronů	70 eV
Teplota iontového zdroje	200 °C
Skenovací rozsah m·z ⁻¹	30–370 amu
Rychlost skenování	0,2 s

3.5. Statistické zpracování výsledků

Výsledky byly zpracovány a vyhodnoceny pomocí programů MS Excel 2016 a STATISTICA 13 a jsou vyjádřeny ve tvaru průměr ± směrodatná odchylka. Plánovaný experiment byl navrhnout a vygenerován pomocí statistického programu STATISTICA 13. Statistické rozdíly mezi vzorky byly stanoveny pomocí parametrické jednofaktorové analýzy rozptylu (ANOVA – Analysis of Variance) s využitím Tukeyho HSD testu. Veškeré statistické testy byly nastaveny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

Podstatou této práce bylo optimalizovat extrakci biologicky aktivních látek aronie (*Aronia melanocarpa*), tak aby byly z rostlinného materiálu získány co možná nejšetrněji a nejefektivněji. Získaný optimální extrakt byl charakterizován celkovým množstvím polyfenolů, stanovením antioxidační aktivity, obsahem antokyanových barviv a profilem těkavých (aromatických) látek.

4.1. Optimalizace extrakce/macerace

Experiment extrakcí se tradičně plánuje jako tzv. jednorozměrová analýza dat (one-factor-at-a-time, OFAT). To znamená, že se zkoumané faktory mění jeden po druhém v samostatných experimentech. Výsledky OFAT analýz nezahrnují možné interakce mezi jednotlivými faktory, navíc jde o časově náročný proces s velkou spotřebou materiálu. Alternativou k jednorozměrové analýze je multifaktoriální analýza dat – tzv. plánovaný experiment (Design of Experiment, DOE) [61]. Při plánovaném experimentu se stanoví sledovaná odezva, v tomto případě byl zvolen celkový obsah polyfenolů, sledované faktory a jejich variabilita (rozmezí hodnot, ve kterém je odezva sledována). Na rozdíl od OFAT, plánovaný experiment umožňuje studovat vliv více nezávislých proměnných a jejich interakcí na závislou proměnnou (celkový obsah polyfenolů) [21].

Metoda DOE byla pro extrakci polyfenolů z aronie použita v několika studiích. Čujic a kol. [20] optimalizovali extrakci sušené aronie. Extrakční metodou byla také macerace a zkoumali vliv: rozpouštědla, poměru navážka-rozpouštědlo, doby extrakce a velikosti částic. DOE se 4 faktory poté nastavili jako full factorial design 2^4 . Ramić a kol. [21] ve své práci použili pokročilejší verzi plánovaného experimentu – Response Surface Methodology (RSM). Autoři optimalizovali metodu pro využití vedlejších produktů z výroby filtrovaného aroniového čaje. Jejich vybranou metodou extrakce byl ultrazvuk (UAE) a zkoumanými faktory síla ultrazvuku, teplota a doba extrakce. Plánovaný experiment byl aplikován i při stanovení nejlepších extrakčních podmínek pro získání polyfenolů z *Vitis vinifera* autory Moldovan a kol. [62]. Ti sledovali extrakční podmínky pro tři typy matrice – červené výlisky, bílé výlisky a stopky. Vstupní proměnné byly teplota a poměr etanolu, odezvou celkový obsah polyfenolů. Výsledné optimální podmínky pro extrakci polyfenolů byly stanoveny na teplotu 80 °C a 50% etanol.

Extrakce je fyzikálně-chemický proces přenosu hmoty, při kterém hraje významnou roli množství faktorů [20], v této práci byly vybrány a sledovány 4: teplota, rozpouštědlo, navážka a doba extrakce.

4.1.1. Úvodní screening faktorů

Extrakce, resp. macerace, byla optimalizována na základě čtyř výše zmíněných faktorů – času, teploty, navážky a rozpouštědla. Čas byl v předběžném měření zkoumán v rozmezí 30 minut až 24 hodin. Teplota byla nastavena ve vodní lázni na minimálně 20 °C a maximálně 60 °C, navážka byla mezi 2,5 g a 15 g na 50 ml a jako rozpouštědlo byl vybrán etanol/voda, který byl namíchan od 0 % do 70 %. Rozpouštědlo bylo pro měření teploty, času a navážky použito 50%, teplota byla pro měření času, navážky a rozpouštědla laboratorní,

navážka byla pro stanovení času, teploty a rozpouštědla 10 g na 50 ml, a extrakce probíhala 60 minut. Tyto podmínky jsou přehledně shrnuty v Tabulka 3.

Tabulka 3 Podmínky extrakce pro předběžná stanovení (testované faktory)

navážka	rozpouštědlo – etanol			teplota	doba			
50% EtOH	3 g	20 °C	0%	50% EtOH	20 °C	50% EtOH	30 min	240 min
20 °C	5 g	6 g	30%	6 g	30 °C	6 g	90 min	360 min
50 ml	10 g	30 ml	50%	30 ml	40 °C	30 ml	120 min	600 min
60 min	15 g	60 min	70%	60 min	60 °C	20 °C	180 min	1440 min

Předběžné experimenty byly navrženy na základě publikací Čujić a kol. [20], kteří svou práci založili na optimalizaci extrakce polyfenolů ze sušené aronie pomocí macerace a podle Ramić a kol. [21], kteří se zaměřují na modelování a optimalizaci extrakce polyfenolů aronie pomocí ultrazvuku.

Faktory byly podrobeny prvotnímu screeningu, kdy byl u každého sledován trend nárůstu celkového obsahu polyfenolů v získaném extraktu. Každá extrakce byla provedena ve třech paralelních maceracích, a každý macerát byl třikrát proměřen na spektrofotometru (n=9). Výsledkem těchto předběžných stanovení byly minimální a maximální hodnoty (v textu označené jako -1 a +1) pro vygenerování modelu DOE (viz Tabulka 9).

Každý faktor byl statisticky popsán základní analýzou dat – byla určena normalita dat podle Shapiro-Wilkova testu a pokud data vyhovovala Leveneho testu homogenního rozptylu dat, byla dále vyhodnocena analýzou rozptylu (ANOVA). Nakonec byly sledované hodnoty proměnných rozděleny do skupin podle toho, jestli je mezi nimi statisticky významný rozdíl. Na toto dělení do skupin byl použit Tukeyho HSD test. Statistické testy jsou postaveny na dvou základních hypotézách. Tzv. nulová hypotéza H_0 předpokládá, že rozdíly mezi daty nejsou statisticky významné, alternativní hypotéza H_1 předpokládá opak. Při intervalu spolehlivosti nastaveném na 95 %, platí H_0 pokud je $p > 0,05$ a H_1 v případě $p < 0,05$ a $F > F_{krit}$. [63].

4.1.1.1. Vliv navážky na celkový obsah polyfenolů

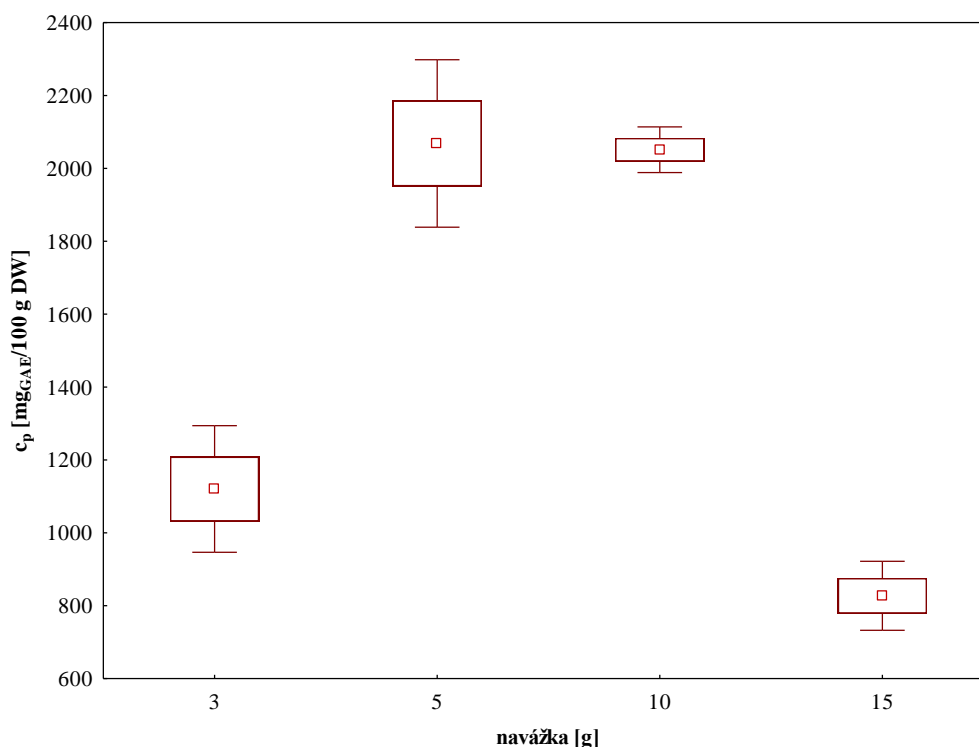
Podmínky při sledování vlivu navážky jsou uvedeny v Tabulka 3. Pro předběžná stanovení byly vybrány navážky 3, 5, 10 a 15 g na 50 ml rozpouštědla (50% etanol). Získané hodnoty celkového množství polyfenolů byly zprůměrovány (n=9) a jsou v rozmezí od $827,2 \pm 107,9$ do $2068,4 \pm 234,5$ mg_{gae}/100 g DW. Hodnoty jsou zapsány v Graf 3 a Tabulka 4 Celkový obsah polyfenolů při sledování vlivu navážky a jejich rozdělení podle statistického rozptylu Tukeyho HSD testem (^a, ^b).

Naměřené hodnoty jsou podle statistického zhodnocení normální (Shapiro-Wilkův test, $p > 0,05$), s homogenním rozptylem (Leveneho test, $p > 0,05$). Podle Tukeyho HSD testu rozptylu spadají navážky do dvou skupin, v Tabulka 4 Celkový obsah polyfenolů při sledování vlivu navážky a jejich rozdělení podle statistického rozptylu Tukeyho HSD testem (^a, ^b) označené jako ^a a ^b. Toto rozdělení je zřejmé i z Graf 3, kdy skupina ^b (5 a 10 g na 50 ml)

má výrazně vyšší obsah polyfenolů, a proto byly tyto hodnoty vybrány jako krajní body (5 g (-1) a 10 g (+1)) pro plánovaný experiment. Toto pozorování je v souladu s výsledky Ramić a kol. [21], kteří ve svých experimentech použili jako základní navážku 20 g na 100 ml rozpouštědla. Čujic a kol [20], došli k jiným závěrům, testovali poměry navážka:rozpouštědlo 1:10, 1:20 a 1:30 a jako hranice pro faktoriální experiment získali 1:20(-1) a 1:30 (+1) a výsledně poměr 1:20 jako nejoptimálnější. Trend, který pozorovali, lze vysvětlit tím, že díky většímu poměru navážka:rozpouštědlo, je k dispozici více rozpouštědla pro extrakci polyfenolů a tím pádem se jich vyextrahuje větší množství. V této práci se tento jev, ale neprokázal a jako hraniční body byly nastaveny poměry 1:10 (-1) a 1:5 (+1).

Tabulka 4 Celkový obsah polyfenolů při sledování vlivu navážky a jejich rozdělení podle statistického rozptylu Tukeyho HSD testem (^a, ^b)

navážka [g] v 50 ml	c _{polyfenoly} [mg _{gae} /100 g DW]	min [mg _{gae} /100 g DW]	max [mg _{gae} /100 g DW]
3	1120,3 ^a ± 198,2	876,8	1376,8
5	2068,4 ^b ± 234,5	1739,1	2279,0
10	2051,2 ^b ± 71,5	1960,87	2102,9
15	827,2 ^a ± 107,9	700,7	975,5



Graf 3 Grafické znázornění vlivu navážky na celkovou koncentraci polyfenolů

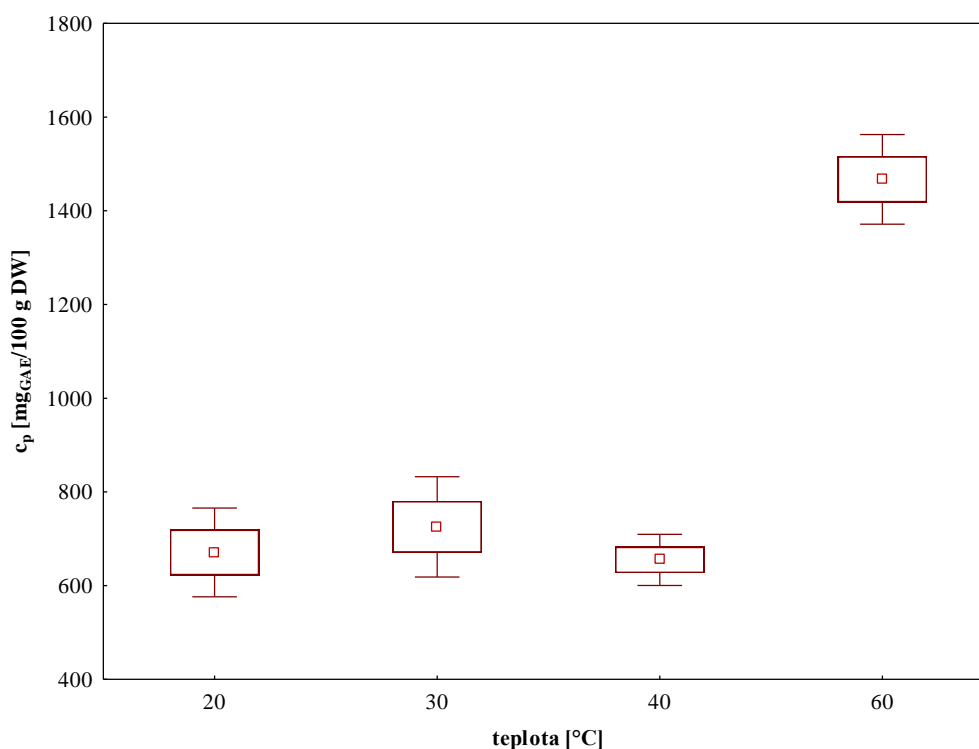
4.1.1.2. Vliv teploty na celkový obsah polyfenolů

Dalším zkoumaným faktorem byl vliv teploty v rozmezí 20 až 60 °C, ostatní faktory byly konstantní a jsou zaznamenány v Tabulka 3. Vyextrahované hodnoty polyfenolů byly zprůměrovány (n=9) a pohybovaly se od 655,0 ± 68,2 do 1467,2 ± 119,5 mg_{gae}/100 g DW. Koncentrace celkových polyfenolů při jednotlivých teplotách jsou zapsány v Tabulka 5 a zobrazeny v Graf 4.

Statistickou analýzou byla stanovena normálnost dat, homogenita rozptylu a pomocí Tukeyho testu bylo zjištěno, jestli jsou mezi jednotlivými teplotami statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$). Tukeyho HSD test rozdělil teploty do dvou skupin rozptylu, v Tabulka 5 Tabulka 5 Celkový obsah polyfenolů při sledování vlivu teploty a jejich rozdělení podle statistického rozptylu Tukeyho HSD testem (^a, ^b) označeny jako ^a a ^b. Teploty 20, 30 a 40 °C patří do jedné skupiny a teplota 60 °C do druhé. Z tohoto měření lze konstatovat, že teplota má na extrakci významný vliv. Pro plánovaný experiment DOE byla vybrána hodnota 30 °C jako (-1), protože při ní byla ze skupiny ^a nejvyšší koncentrace polyfenolických látek, a 60 °C (+1).

Tabulka 5 Celkový obsah polyfenolů při sledování vlivu teploty a jejich rozdělení podle statistického rozptylu Tukeyho HSD testem (^a, ^b)

teplota [°C]	$c_{\text{polyfenoly}}[\text{mg}_{\text{gae}}/100 \text{ g DW}]$	min [$\text{mg}_{\text{gae}}/100 \text{ g DW}$]	max [$\text{mg}_{\text{gae}}/100 \text{ g DW}$]
20	$670,0^{\text{a}} \pm 96,7$	570,5	766,0
30	$725,5^{\text{a}} \pm 109,2$	578,5	837,0
40	$655,0^{\text{a}} \pm 68,2$	600,3	781,7
60	$1467,2^{\text{b}} \pm 119,5$	1325,9	1650,0



Graf 4 Grafické znázornění vlivu teploty na celkovou koncentraci polyfenolů

4.1.1.3. Vliv rozpouštědla na celkový obsah polyfenolů

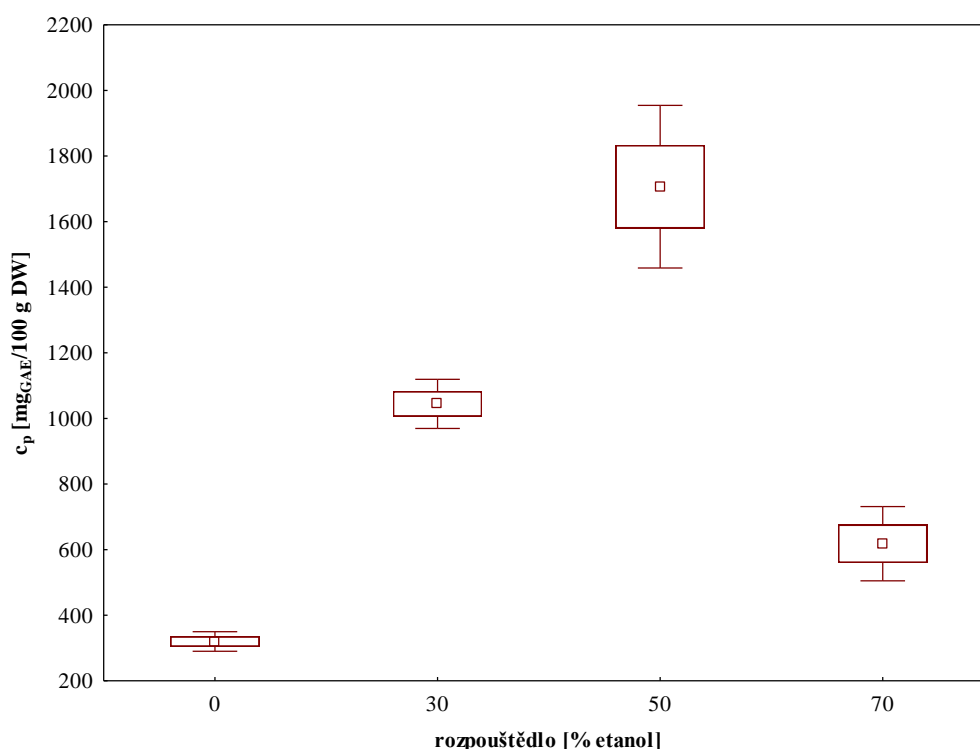
Jako rozpouštědlo se pro extrakci polyfenolů často používá kombinace etanol-voda v různých poměrech. Pro tento proces je voda zásadní tím, že díky ní rostlinný materiál nabyde, a etanol svou schopností rozrušit vazby mezi rostlinnou maticí a rozpustnými látkami [20]. Pro tuto část experimentu byly vybrány koncentrace etanolu o 30, 50 a 70 % a destilovaná voda.

Hodnoty byly vybrány na základě experimentu Ramić a kol. [21]. Výsledné zprůměrované ($n=9$) hodnoty extrahovaných polyfenolů byly naměřeny mezi $320,0 \pm 37,3$ a $1706,5 \pm 219,0$ $\text{mg}_{\text{gae}}/100$ g DW a jsou zaznamenány v Tabulka 6 a Graf 5.

Data byla opět statisticky charakterizována jako normální (Shapiro-Wilkův test, $p > 0,05$) s homogenním rozptylem (Leveneho test, $p > 0,05$). Analýza rozptylu rozdělila koncentrace do 4 skupin. V tomto případě byla každá hodnota přidělena do své vlastní skupiny a to potvrzuje, že rozpouštědlo má významný vliv na průběh extrakce. Jako nejúčinnější extrahovadlo se prokázal 50% etanol. Tento závěr je v souladu, s již zmiňovanými výzkumy v člancích autorů Čujić a kol. [20] a Ramić a kol. [21]. Pro plánovaný experiment byly jako hraniční hodnoty vybrány 30% (-1), protože vykazoval druhý nejvyšší extrakční potenciál, a 50% etanol (+1).

Tabulka 6 Celkový obsah polyfenolů při sledování vlivu rozpouštědla a jejich rozdělení podle statistického rozptylu Tukeyho HSD testem (a, b, c, d)

rozpouštědlo [% etanolu]	$c_{\text{polyfenoly}} [\text{mg}_{\text{gae}}/100 \text{ g DW}]$	min [$\text{mg}_{\text{gae}}/100 \text{ g DW}$]	max [$\text{mg}_{\text{gae}}/100 \text{ g DW}$]
0	$320,0^a \pm 37,3$	279,8	374,5
30	$1044,4^b \pm 76,3$	954,3	1126,1
50	$1706,5^c \pm 219,0$	1568,2	1959,0
70	$618,1^d \pm 141,4$	436,9	867,4



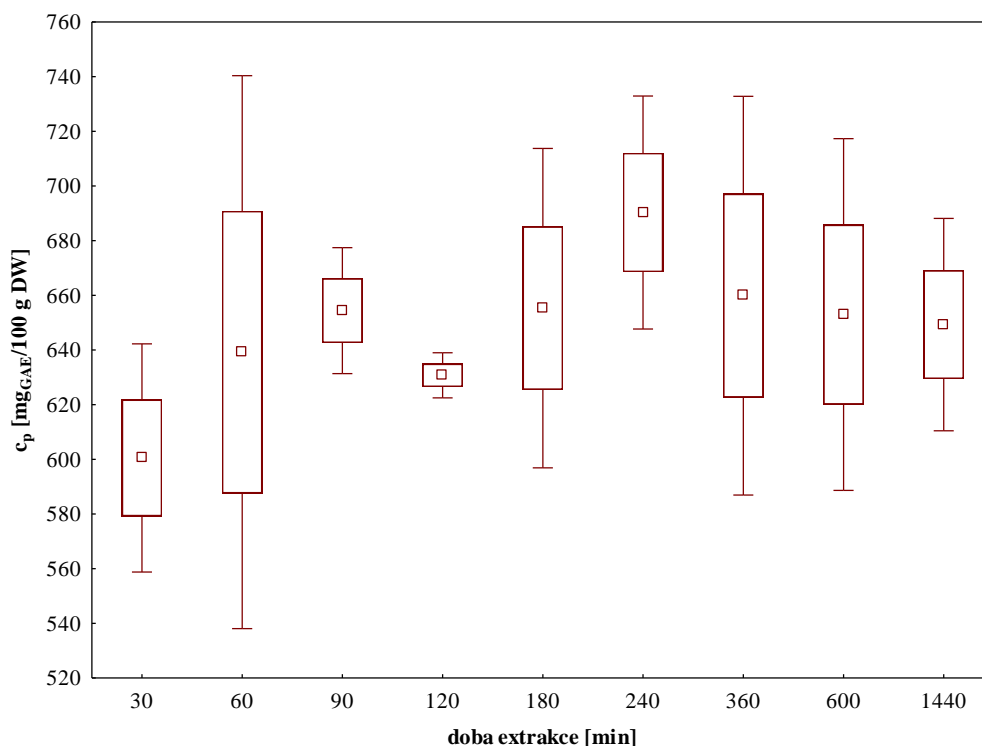
Graf 5 Grafické znázornění vlivu rozpouštědla na celkovou koncentraci polyfenolů

4.1.1.4. Vliv doby extrakce na celkový obsah polyfenolů

Posledním sledovaným faktorem byla doba extrakce v rozmezí od 30 do 1440 minut. Data byla statisticky popsána Shapiro-Wilkovým testem normality ($p > 0,05$), Leveneho testem homogenního rozptylu ($p > 0,05$) a následně Tukeyho HSD testem. Z tabulky průměrných hodnot ($n=9$) (Tabulka 7), Graf 6 a Tukeyho testu lze vyvodit závěr, že doba extrakce nemá na celkový obsah polyfenolů významný vliv. Nicméně, mezi dobou extrakce 30 a 120 min, lze sledovat nárůst koncentrace polyfenolů, proto byly jako hraniční hodnoty pro plánovaný experiment vybrány 30 min (-1) a 120 min (+1). Navíc má hodnota 120 min menší odchylku a dá se tak říct, že naměřené hodnoty jsou přesnější, než pro 90 min, které by se také nabízely. Čujić a kol. [20] ve svém experimentu pozorovali prvotní nárůst polyfenolů (do 60. minuty) a poté pouze pomalý proces extrakce, s nejvyšším obsahem polyfenolů v 90. minutě [20]. Z výsledků vyplývá, že extrakce je poměrně rychlá, což lze vysvětlit tím, že aronie byla namleta na jemný prášek, tím pádem byla plocha extrakce takřka maximální, a proto stačilo pouze 30 minut na extrakci většiny látek. S delší dobou macerace se výtěžek prakticky neměnil.

Tabulka 7 Celkový obsah polyfenolů při sledování vlivu doby extrakce a jejich rozdělení podle statistického rozptylu Tukeyho HSD testem (^a)

doba extrakce [min]	$c_{\text{polyfenoly}} [\text{mg}_{\text{gae}}/100 \text{ g DW}]$	min [$\text{mg}_{\text{gae}}/100 \text{ g DW}]$	max [$\text{mg}_{\text{gae}}/100 \text{ g DW}]$
30	$600,5^a \pm 52,2$	512,8	657,7
60	$639,2^a \pm 89,4$	570,5	740,3
90	$654,4^a \pm 26,3$	621,1	690,1
120	$630,7^a \pm 9,4$	614,6	636,4
180	$655,3^a \pm 59,6$	587,6	730,3
240	$690,3^a \pm 43,5$	631,9	737,0
360	$660,0^a \pm 74,4$	563,2	724,6
600	$653,0^a \pm 65,6$	607,0	747,8
1440	$649,3^a \pm 44,3$	593,3	697,4



Graf 6 Grafické znázornění vlivu doby extrakce na celkovou koncentraci polyfenolů

4.1.2. Plánovaný experiment (DOE)

Po screeningu vstupních faktorů byl v programu STATISTICA 13 vygenerován plánovaný experiment (DOE). Jako závislá proměnná byl zvolen celkový obsah polyfenolických látek, měřený metodou podle Folin-Ciocalteu.

V této práci byl vybrán plný faktorový design s počtem nezávislých proměnných (faktorů) $k=4$, jmenovitě byl sledován vliv teploty, navážky, koncentrace rozpouštědla (etanolu) a doby macerace. Počet měření se vypočítá jako 2^k , což v tomto případě dělá 2^4 , respektive 16 měření. K těmto 16 měřením byly přidány 2 centrální body (označeny 0) pro minimalizaci šumu. Hraniční body jednotlivých faktorů byly vybrány na základě analýzy rozptylu předběžných měření (kap. 4.1.1) a jsou shrnuty v Tabulka 8. Výsledný experimentální plán zahrnoval 18 macerací (viz Tabulka 9), které byly v náhodném pořadí rozděleny do dvou bloků a samotné měření bylo provedeno ve dvou po sobě následujících dnech. Tímto se mělo předejít jakýkoliv jiným vlivům (zejména prostředí) při provádění experimentu.

Z těchto výsledků byly vybrány statisticky nejvýhodnější podmínky macerace pro získání optimálního extraktu. Postup přípravy vzorku a samotná extrakce byly provedeny stejně jako u předběžných stanovení.

Tabulka 8 Hraniční hodnoty jednotlivých faktorů pro plný faktoriální design

Faktor	Spodní hladina (-1)	Horní hladina (+1)
Navážka (na 50 ml)	5 g	10 g
Teplota macerace	30 °C	60 °C
Koncentrace etanolu	30 %	50 %
Doba macerace	30 min	120 min

Hlavním výstupem plánovaného experimentu (DOE) je vliv jednotlivých faktorů na výstupní hodnotu – celkový obsah polyfenolických látek. Pozorované a předpovídané hodnoty (vypočítané algoritmem) jsou zapsány v Tabulka 9. Hodnoty jsou dále zobrazeny v Paretově grafu (viz Graf 7), který zobrazuje nejen vliv jednotlivých faktorů, ale i jejich vzájemné kombinace.

Tabulka 9 Plánovaný experiment 24 včetně pozorovaných a předpovídaných koncentrací polyfenolických látek

blok	etanol [%]	čas [min]	navážka [g] (na 50 ml)	teplota [°C]	celkový obsah polyfenolických látek [mg _{gae} /100 g DW]	
					pozorované	předpovídané
1	30 (-1)	120 (1)	5 (-1)	30 (-1)	1207,921	1044,288
1	50 (1)	120 (1)	10 (1)	30 (-1)	767,1234	875,710
1	50 (1)	30 (-1)	5 (-1)	30 (-1)	1143,176	1298,224
1	40 (0)	75 (0)	7,5 (0)	45 (0)	1035,554	1088,580
1	30 (-1)	120 (1)	10 (1)	60 (1)	1158,004	1082,922
1	30 (-1)	30 (-1)	5 (-1)	60 (1)	1287,02	1258,398
1	50 (1)	30 (-1)	10 (1)	60 (1)	609,4477	853,047
1	50 (1)	120 (1)	5 (-1)	60 (1)	1276,513	1185,597
1	30 (-1)	30 (-1)	10 (1)	30 (-1)	939,572	1110,454
2	40 (0)	75 (0)	7,5 (0)	45 (0)	876,8097	1088,580
2	30 (-1)	30 (-1)	5 (-1)	30 (-1)	1303,169	1243,215
2	50 (1)	120 (1)	10 (1)	60 (1)	972,3826	886,172
2	30 (-1)	120 (1)	5 (-1)	60 (1)	1140,26	1326,270
2	50 (1)	120 (1)	5 (-1)	30 (-1)	1103,296	1105,636
2	30 (-1)	30 (-1)	10 (1)	60 (1)	1204,642	1056,137
2	30 (-1)	120 (1)	10 (1)	30 (-1)	883,9333	870,440
2	50 (1)	30 (-1)	10 (1)	30 (-1)	1441,558	1109,384
2	50 (1)	30 (-1)	5 (-1)	60 (1)	1244,057	1111,386

Paretův graf (Graf 7) ukázal, že žádný z faktorů není významný – nepřesahuje červenou čáru, která zobrazuje úroveň významnost $p < 0,05$. Což znamená, že žádný z faktorů, nebo jejich kombinace, nemá na celkový zisk polyfenolických látek významný vliv. Proto byly jako optimální podmínky vybrány ty, které při DOE experimentu dávaly nejvyšší obsah polyfenolických látek. Tyto podmínky byly 50% etanol, 30 minut, 10 g na 50 ml a 30 °C a v Tabulka 9 jsou zvýrazněny tučně. Při tomto výběru bylo přihlédnuto k výsledkům předběžných stanovení, při kterých 50% etanol vyšel jako významně nejlepší rozpouštědlo. Doba extrakce při screeningu nebyla významná, a je tedy nasnadě vybrat tu nejkratší, když po delší době nedojde k výrazně vyšším výtěžkům. Navážky 5 a 10 g byly v předběžných stanoveních Tukeyho testem přiděleny do stejné skupiny statistické významnosti, ale navážka 10 g měla výrazně menší chybu (viz Graf 3).

V předběžných stanoveních byl sice získán významně nejvyšší výtěžek při 60 °C, DOE ale významný vliv teploty nepotvrdil, a proto byla vybrána nižší teplota 30 °C, která je zároveň ekonomičtější. Čujic a kol. [20] došli pomocí DOE k závěru, že z faktorů velikost částic, různá rozpouštědla, navážka a doba extrakce, pouze čas nemá na extrakci významný vliv

a jejich výsledné optimální podmínky byly stanoveny na 50% etanol, částice velikosti 0,75 mm a navážka v poměru k rozpouštědлу 1:20.

Podmínky optimální extrakce byly vybrány na základě předběžných stanovení a navazujícího vícefaktorového plánovaného experimentu DOE a byly stanoveny na:

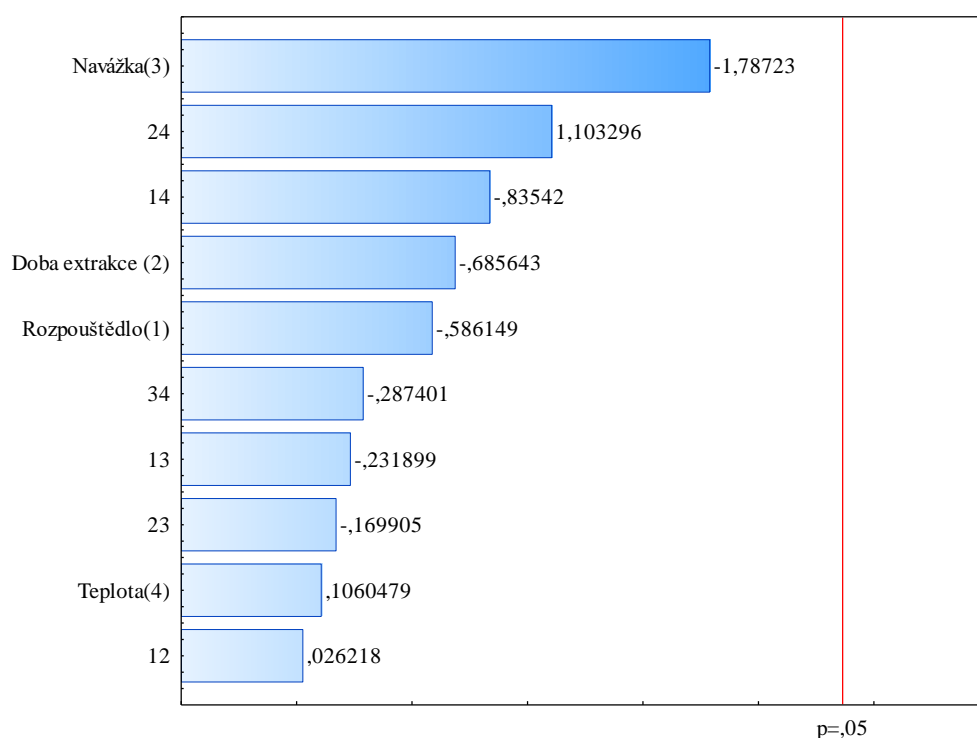
navážka: **10 g/ 50 ml**

teplota: **30 °C**

rozpouštědlo: **50% etanol**

doba extrakce: **30 minut**

Takto získaný extrakt/macerát byl tedy vybrán jako optimální a jeho charakterizace je uvedena v kapitole 4.4.



Graf 7 Paretův graf zobrazující významnost jednotlivých parametrů a jejich kombinací. Hladina spolehlivosti je nastavena na 95 %.

4.2. Hodnocení extrakce stlačenou horkou vodou (PHWE)

Jako nekonvenční metoda byla v této práci použita extrakce horkou vodou, která byla prováděna na Ústavu analytické chemie AV ČR v Brně. Při této metodě byl zkoumán vliv teploty na kvalitu extrakce a jako rozpouštědlo byla použita deionizovaná voda. Pro stanovení optimálních podmínek byl extrakt charakterizován opět pomocí Folin-Ciocalteua a těkavé látky byly stanoveny pomocí HS-SPME-GC-MS.

Extrakce stlačenou vodou byla provedena ve dvou sériích experimentů a tentokrát byl aplikován jednoduchý přístup OFAT. v první sérii byl zkoumán vliv teploty na extrakci při fixní navážce a době extrakce. Teploty byly nastaveny od 40 do 180 °C s krokem 20 °C. Z tohoto experimentu byla vybrána teplota, při které byla extrakce nejúčinnější a při té se

v druhém kole pokračovalo s porovnáním tří navážek (0,5; 0,75 a 1 g) a s extrakcí v cyklech. Podmínky extrakcí jsou přehledně uvedeny v Tabulka 10.

Tabulka 10 Podmínky extrakcí stlačenou horkou vodou (testované faktory)

teplota		navážka		cykly	
1 g	40 °C 120 °C	5 min	0,5 g	5 min/1 cyklus	6 cyklů
5 min	60 °C 140 °C	15 MPa	0,75 g	120 °C	
15 MPa	80 °C 160 °C	120 °C	1 g		
	100 °C 180 °C				

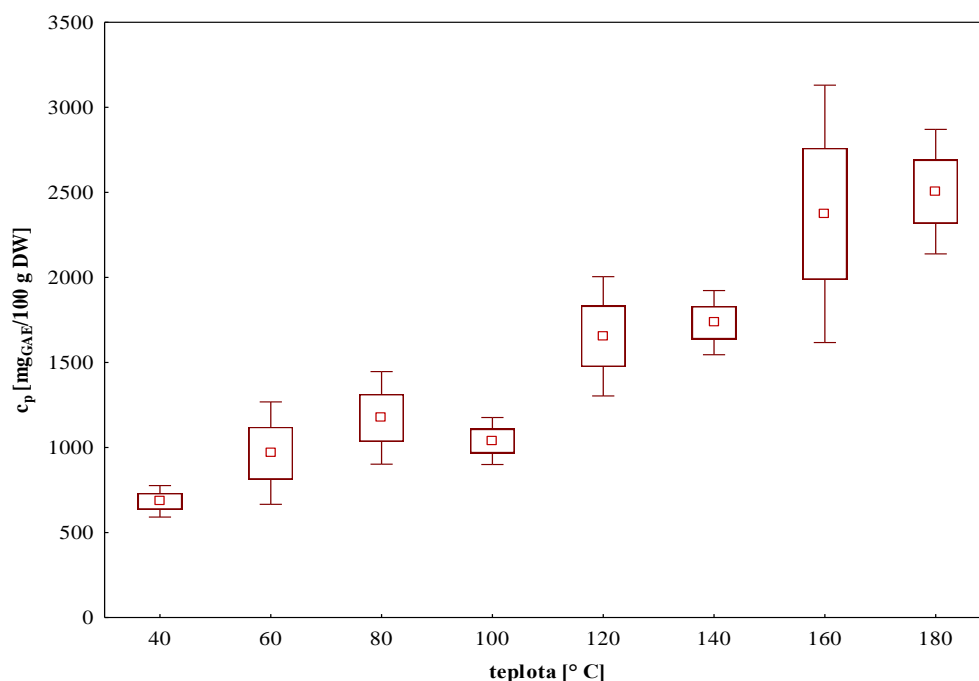
4.2.1. Stanovení optimální teploty pro PHWE

V prvním kole experimentů byl zkoumán vliv teploty na zisk fenolických látek. Extrakce byla provedena deionizovanou vodou při teplotách 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 a 180 °C. Získané extrakty byly hodnoceny na základě celkového množství polyfenolů. U naměřených hodnot byl pro každou teplotu stanoven průměr (n=3), směrodatná odchylka a byly zobrazeny v krabicovém grafu (viz Graf 8 a Tabulka 11). Data byla podle Shapiro-Wilkova testu normální ($p > 0,05$). Koncentrace polyfenolů se pohybovala od 626,1 do 3135,7 $\text{mg}_{\text{gae}}/100 \text{ g DW}$ a data byla rozdělena Tukeyho HSD testem do tří skupin, do jedné skupiny (^a) byly zařazeny teploty 40-100 °C, zbytek teplot 120-180 °C do skupiny ^c a do skupiny ^b průnik obou skupin – teploty 60-140 °C.

Za optimální teplotu bylo vybráno 120 °C ($1653,9 \pm 310,1 \text{ mg}_{\text{gae}}/100 \text{ g DW}$). Z výsledků je sice patrné, že nejvyšší obsah celkových polyfenolů byl při 160 a 180 °C, ale bylo přihlédnuto k dalším faktorům. Na obrázku (viz Obrázek 13) lze vidět, že při těchto vyšších teplotách už barva extraktu přecházela z tmavě červené do hnědočervené barvy a samotné extrakty voněly lehce po spálenině. Protože cílem této práce je získat ideální extrakt pro možné zapracování do potravinářského produktu, tyto senzorycké vlastnosti by nebyly žádoucí. Jako další se nabízela teplota 140 °C, ta ale také už lehce nabývala nahnědlou barvu a při statistickém porovnání s teplotou 120 °C nevykazovala významný rozdíl. Z tohoto důvodu byla nakonec pro další experimenty vybrána teplota 120 °C.

Tabulka 11 Celkový obsah polyfenolů pro faktor teploty a jejich rozdělení podle statistického rozptylu Tukeyho HSD testem (^a, ^b, ^c)

teplota [°C]	$c_{\text{polyfenoly}} [\text{mg}_{\text{gae}}/100 \text{ g DW}]$	min [$\text{mg}_{\text{gae}}/100 \text{ g DW}$]	max [$\text{mg}_{\text{gae}}/100 \text{ g DW}$]
40	$683,5 \pm 82,2^{\text{a}}$	626,1	777,4
60	$967,0 \pm 266,0^{\text{ab}}$	746,1	1262,6
80	$1173,9 \pm 240,1^{\text{ab}}$	986,1	1445,2
100	$1038,3 \pm 122,3^{\text{ab}}$	960,0	1179,1
120	$1653,9 \pm 310,1^{\text{bc}}$	1299,1	1873,0
140	$1733,9 \pm 166,8^{\text{bc}}$	1544,3	1857,4
160	$2373,9 \pm 668,2^{\text{c}}$	1883,5	3135,7
180	$2504,3 \pm 323,4^{\text{c}}$	2139,1	2754,8



Graf 8 Grafické znázornění vlivu teploty při PHWE na celkový obsah polyfenolů



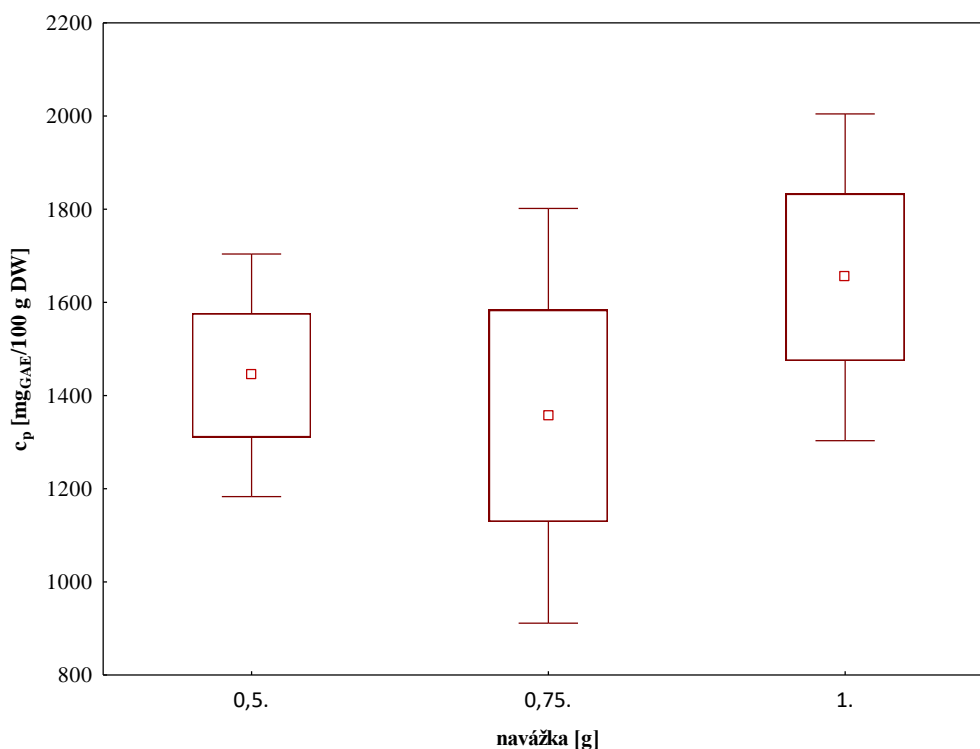
Obrázek 13 Extrakty získané metodou PHWE, 40-180 °C (zleva doprava).

4.2.2. Sledování vlivu navážky při PHWE

Vliv navážky na množství extrahovaných látek byl sledován u navážek 0,5 g, 0,75 g a 1 g. Data jsou podle Shapiro-Wilkova testu normální ($p > 0,05$) a podle Leveneho testu homogenní ($p > 0,05$), díky tomu byla dále použita ANOVA. Po aplikaci Tukeyho HSD testu na data vyšlo, že mezi navážkami není významný statistický rozdíl. Z tohoto se dá vyvodit závěr, že pro PHWE extrakci by byla navážka 0,5 g dostatečná. V Tabulka 12 jsou zaznamenány průměry koncentrací, které se pohybovaly od 1356,5 do 1653,9 $\text{mg}_{\text{gae}}/100 \text{ g DW}$.

Tabulka 12 Celkový obsah polyfenolů pro faktor navážky a jejich rozdělení podle statistického rozptylu Tukeyho HSD testem (^a)

navážka[g]	$c_{\text{polyfenoly}}[\text{mg}_{\text{gae}}/100 \text{ g DW}]$	min [$\text{mg}_{\text{gae}}/100 \text{ g DW}$]	max [$\text{mg}_{\text{gae}}/100 \text{ g DW}$]
0,5	$1443,5 \pm 230,1^{\text{a}}$	1189,6	1638,3
0,75	$1356,5 \pm 393,5^{\text{a}}$	1335,7	1760,0
1	$1653,9 \pm 310,1^{\text{a}}$	1299,1	1873,0



Graf 9 Grafické znázornění celkového obsahu polyfenolů při různých navážkách po PHWE

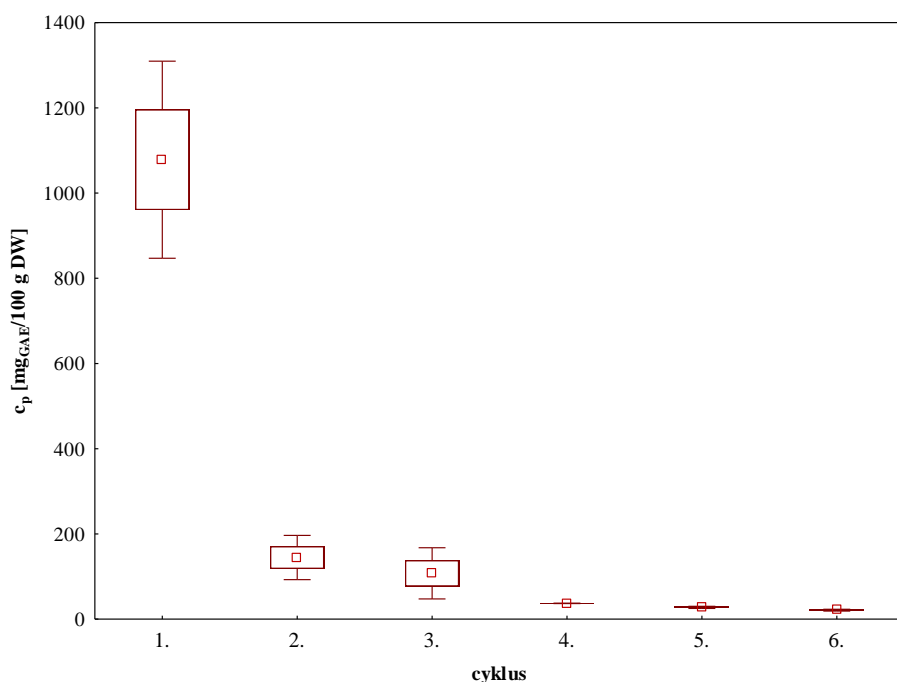
4.2.3. Porovnání extrakčních cyklů

Několikanásobná extrakce se používá pro zjištění, kolik extrakcí jednoho vzorku umožňuje co nejvyšší využití jeho extrakčního potenciálu. Navážka 1 g byla extrahována při 120 °C v šesti cyklech po dvou minutách. Obsah polyfenolů v jednotlivých cyklech je zobrazen v Tabulka 13 a Graf 10 Sledování významnosti cyklické extrakce při PHWE. Nejvyšší obsah polyfenolů byl podle očekávání naměřen v prvním cyklu ($1078,3 \pm 204,4$ mg_{gae}/100 g DW) a nejnižší v posledním, šestém, cyklu ($21,2 \pm 1,9$ mg_{gae}/100 g DW).

Pro zhodnocení toho, jestli se vyplatí několikanásobnou extrakci provádět, byla množství polyfenolů postupně sčítána a poté zhodnocena statistickými metodami. U dat byla potvrzena jak normalita, tak homogenost a po aplikaci Tukeyho HSD testu bylo zjištěno, že mezi kumulativními hodnotami není statisticky významný rozdíl. Několikanásobná extrakce tedy v tomto případě není významná a stačí provést pouze jeden cyklus.

Tabulka 13 Celkový obsah polyfenolů v jednotlivých cyklech a jejich rozdělení podle statistického rozptylu Tukeyho HSD testem (^a, ^b)

cyklus [°C]	c _{polyfenoly} [mg _{gae} /100 g DW]	min [mg _{gae} /100 g DW]	max [mg _{gae} /100 g DW]
1.	$1078,3 \pm 204,4^a$	855,7	1257,4
2.	$144,7 \pm 45,9^b$	91,8	174,3
3.	$107,5 \pm 53,1^b$	68,9	168
4.	$37,1 \pm 0,5^b$	36,6	37,5
5.	$27,7 \pm 2,3^b$	25,9	30,3
6.	$21,2 \pm 1,9$	19,7	23,3



Graf 10 Sledování významnosti cyklické extrakce při PHWE

4.3. Stanovení těkavých látek v PHWE extraktech při různých teplotách

Těkavé látky byly stanoveny metodou HS-SPME-GC-MS, identifikovány byly pomocí hmotnostních spekter a knihovny spekter a jejich obsah byl semikvantitativně stanoven na základě plochy píků. Podmínky, za kterých byla analýza prováděna, jsou uvedeny v experimentální části (3.4.4). Už podle barvy extraktu (viz Obrázek 13) bylo zřejmé, že teplota má na extrakci aronie pomocí PHWE značný vliv. v Graf 8 je zobrazeno celkové množství polyfenolických látek v extraktech při daných teplotách, které stoupá se vzrůstající teplotou. Při stanovení těkavých látek se tento jev potvrdil, z chromatogramu při 40 °C bylo identifikováno 17 těkavých látek, z toho pouze 6 s obsahem nad 0,5 % celkového obsahu. Naproti tomu při nejvyšší teplotě 180 °C bylo identifikováno 91 sloučenin a z toho 27 nad 0,5 % obsahu. Pro teplotu 120 °C, která byla stanovena jako ideální pro extrakci pomocí PHWE, bylo identifikováno 27 sloučenin, z toho 19 nad 0,5 %. Vyšší teploty sice obsahovaly větší počet těkavých látek, tyto extrakty ale přecházely v zabarvení ze sytě rudé do červenohnědé a extrakty voněly po spálenině. V této práci byly identifikované sloučeniny (nad 0,5 %) rozděleny do příslušných chemických skupin a podle nich porovnány, co se počtu a procentuálního zastoupení týče (viz Tabulka 14). Vzorový chromatogram je uveden v Příloha 1.

PHWE se používá zejména na relativně polární bioaktivní sloučeniny (polyfenolické látky). Obvykle jsou parametry extrakce polyfenolických látek nastaveny mezi 80-150 °C a doba extrakce mezi 1-60 minutami. v mnoha výzkumech (např. Kim a kol. [47], Plaza a kol. [64] [65]) bylo popsáno, že vyšší teplota (nad 175 °C) je přínosná pro antioxidační aktivitu, tyto práce ale vycházely pouze z výsledků stanovení antioxidační aktivity a celkového obsahu polyfenolů bez přihlédnutí k dalším faktorům, jako je například hnědnutí v důsledku

degradace termolabilních sloučenin [42]. Vyšší teplota zvyšuje antioxidační aktivitu tím, že dochází ke vzniku nových sloučenin s antioxidačními vlastnostmi. Tyto sloučeniny se tvoří karamelizací, Maillardovou reakcí a termo-oxidačními procesy [65]. Plaza a kol. [42] optimalizovali metodu PHWE pro extrakci flavonolů s přihlédnutím k tomu, aby antioxidační aktivita byla co nejvyšší, ale hnědé zbarvení co nejmenší. Došli k podmínkám 120 °C po dobu 3 minut a také pozorovali vznik nových sloučenin s antioxidační kapacitou při vyšších teplotách [42] [64].

Optimální podmínky extrakce samozřejmě závisí na žádané extrahované sloučenině. Při extrakci antokyanů, které jsou termolabilní, se teplota zpravidla nastavuje na nižší teploty mezi 80-120 °C [66]. Při extrakci jak antokyanů, tak flavonolů byla optimální teplota stanovena až na 140 °C [67]. Žádný z jmenovaných autorů zatím nezkoumal vliv tlakové extrakce na profil těkavých látek.

Tabulka 14 Těkavé sloučeniny identifikované v PHWE extraktech při teplotách 40-180 °C, jejich procentuální zastoupení a příslušné retenční časy. Stopové množství (st) < 0,5 %. sk. – chemická skupina, A: aldehydy, AC: aromatický cyklus, E: estery, K: ketony, KM: kyslíkaté monoterpeny, KS: kyslíkaté seskviterpeny, L: laktony, M: monoterpeny, MA: mastné alkoholy, S: seskviterpeny.

RT (min)	sloučenina	40 °C	60 °C	80 °C	100 °C	120 °C	140 °C	160 °C	180 °C	sk.
5,68	3-penten-2-on	-	-	-	-	-	0,93 %	0,80 %	1,19 %	K
7,16 ± 0,01	hexanal	st	0,65 %	-	0,90 %	1,67 %	1,28 %	1,19 %	0,83 %	A
8,43 ± 0,01	trans-3-penten-2-on	3,80 %	3,01 %	4,62 %	8,28 %	12,93 %	16,56 %	21,17 %	19,78 %	K
9,81 ± 0,02	heptanal	st	-	-	st	0,91 %	0,96 %	0,61 %	st	A
12,62 ± 0,02	oktanal	st	-	-	st	0,92 %	0,95 %	st	st	A
15,42 ± 0,01	nonanal	st	0,69 %	st	1,04 %	2,48 %	1,98 %	1,83 %	1,44 %	A
17,31 ± 0,01	isomenthon	4,99 %	6,79 %	8,74 %	10,69 %	12,20 %	11,68 %	6,77 %	4,95 %	KM
18,49	furfural	-	-	-	-	-	-	3,17 %	10,39 %	A
18,51	acetylfuran	-	-	-	-	-	-	-	0,73 %	K
19,02 ± 0,01	benzaldehyd	84,47 %	80,78 %	77,17 %	62,77 %	48,16 %	35,97 %	17,09 %	10,85 %	A
19,69 ± 0,01	menthyl acetát	-	-	-	-	-	-	0,53 %	0,73 %	E
20,22	5-methyl-furfural	-	-	-	-	-	-	-	1,11 %	A
20,53	levomenthol	-	st	-	0,86 %	0,73 %	0,89 %	st	st	KM
21,27 ± 0,01	β-cyclocitral	-	-	-	-	0,87 %	0,74 %	0,65 %	0,59 %	M
21,56 ± 0,01	p-menthan-1-ol	2,24 %	2,16 %	3,03 %	3,81 %	4,12 %	3,49 %	2,73 %	2,07 %	KM
21,88	2-isopropyliden-3-methylhexa-3,5-dienal	-	-	-	-	-	-	-	0,60 %	A
21,88	3-p-menthen-7-al	-	-	-	-	0,61 %	-	-	-	KM
22,42 ± 0,01	estragol	st	0,69 %	1,11 %	1,54 %	2,06 %	1,74 %	1,29 %	1,02 %	KM
23,23	isoleden	-	-	-	-	-	-	-	0,57 %	S
23,54	α-muurolen	-	-	-	-	-	-	st	0,69 %	S
23,94 ± 0,01	L-karvon	2,09 %	2,64 %	3,16 %	3,42 %	4,37 %	2,55 %	1,99 %	1,35 %	KM
24,28	kadina-1(10)-4-dien	-	-	-	-	-	2,61 %	6,31 %	6,59 %	S

RT (min)	sloučenina	40 °C	60 °C	80 °C	100 °C	120 °C	140 °C	160 °C	180 °C	sk.
24,87	1,2,3,4,4a,7-hexahydro-1,6-dimethyl-4-(1-methyl-ethyl)-naftalen	-	-	-	-	-	-	0,81 %	1,64 %	AC
25,39	tridekan-2-on	-	-	-	0,68 %	-	-	-	-	K
26,01	kalamenen	-	-	-	-	-	-	0,83 %	1,59 %	S
26,34 ± 0,01	dihydro-3-methylen-5-methyl-2-furanon	0,62 %	0,57 %	0,78 %	1,09 %	1,85 %	2,54 %	2,36 %	3,00 %	L
26,65	isoshyobunon	-	-	-	-	1,38 %	8,94 %	13,11 %	4,58 %	S
27,83	α-kalakoren	-	-	-	-	-	-	st	0,72 %	S
28,28	β-ionon	-	-	st	st	0,70 %	0,71 %	0,63 %	0,54 %	K
28,65 ± 0,01	dodekanol	-	-	-	st	0,55 %	-	-	st	MA
30,66	1-epi-kubenol	-	-	-	-	-	st	0,57 %	st	KS
30,77	4,5,9,10-dehydro- isolongifolen	-	-	-	-	-	-	-	1,52 %	KM
30,79	di-epi-1,10-kubenol	-	-	-	-	-	0,65 %	1,35 %	-	AC
33,06	thymol	-	-	-	0,58 %	0,59 %	st	-	-	KM
34,91	cypera-2,4-dien	-	-	-	-	-	1,92 %	3,76 %	6,20 %	KS
36,27 ± 0,01	hexyl cinnamal	-	1,72 %	0,67 %	0,73 %	0,75 %	0,50 %	st	st	A
36,92	9,10 dehydro- isolongifolen	-	-	-	-	0,59 %	-	0,55 %	0,92 %	KM
Celkem		98,21 %	99,70 %	99,28 %	96,39 %	98,44 %	97,59 %	90,10 %	86,19 %	

4.3.1. Změna složení identifikovaných těkavých látek při se vzrůstající teplotou

Jak již bylo zmíněno, počet i obsah extrahovaných těkavých látek se lišil v závislosti na použité teplotě při PHWE (viz Tabulka 14). V této kapitole je diskutováno zastoupení jednotlivých skupin těkavých látek, z pohledu počtu a obsahu – viz grafy 11-13. V Graf 11 je znázorněn počet jednotlivých identifikovaných látek podle chemické skupiny, obsah jednotlivých skupin je zaznamenán v Graf 13 a jejich relativní obsah (poměr obsahu dané skupiny ku celkovému obsahu identifikovaných těkavých látek v daném extraktu) v Graf 12. Do grafů byly zahrnuty pouze sloučeniny ve větším než stopovém množství.

Z celkového obsahu těkavých látek bylo identifikováno nad stopové množství nejvíce 99,70 % (pro 80 °C) a nejméně 86,19 % pro teplotu 180 °C. V Tabulka 14 jsou jednotlivé sloučeniny vypsány.

Terpeny

Hlavní nárůst počtu identifikovaných sloučenin byl od teploty 120 °C a spočíval zejména ve zvyšujícím se počtu aldehydů a terpenových uhlovodíků. Seskviterpeny se v extraktech začaly objevovat až při této teplotě a byly identifikovány sloučeniny isoshyobunon, kadina-1(10)-4-dien, cypera-2,4-dien, α -muurolene a α -kalakoren a pouze při teplotě 180 °C se vyskytující isoleden. Kyslíkaté seskviterpeny byly ve vzorcích 140 a 160 °C, v obou se nacházel 1-epi-kubenol a ve vyšší teplotě navíc di-epi-1,10-kubenol.

Z monoterpenů byl identifikován pouze β -cyclocitral ve vzorcích od 120 do 180 °C. Naopak kyslíkaté monoterpeny byly identifikovány ve všech extraktech s minimálním počtem při 40 °C (3 sloučeniny) a maximálním při teplotách 120 °C (9 sloučenin). Ve všech byly identifikovány isomenthon, L-karvon, p-menthan-1-ol a estragol (při teplotě 40 °C pouze ve st) ve většině extraktů se nacházel levomenthol, Při teplotách 100 a 120 °C byl navíc identifikován thymol, další terpeny jsou vyjmenovány v Tabulka 14.

V teplotách 160 a 180 °C byl identifikován jediný ester (zároveň monocyklický terpen) menthylacetát. Levomenthol, isomenthon a menthylacetát jsou příbuznými sloučeninami mentholu. Menthol je sensoricky aktivní látka s příchutí a vůní peprmintu, která se používá jako ochucovadlo v potravinářských a farmaceutických výrobcích [68].

Co se týče relativního obsahu terpenů (viz), ty tvořily nejmenší část všech sloučenin při teplotě 40 °C – necelých 10 % a největší při teplotě 160 °C – 44 %.

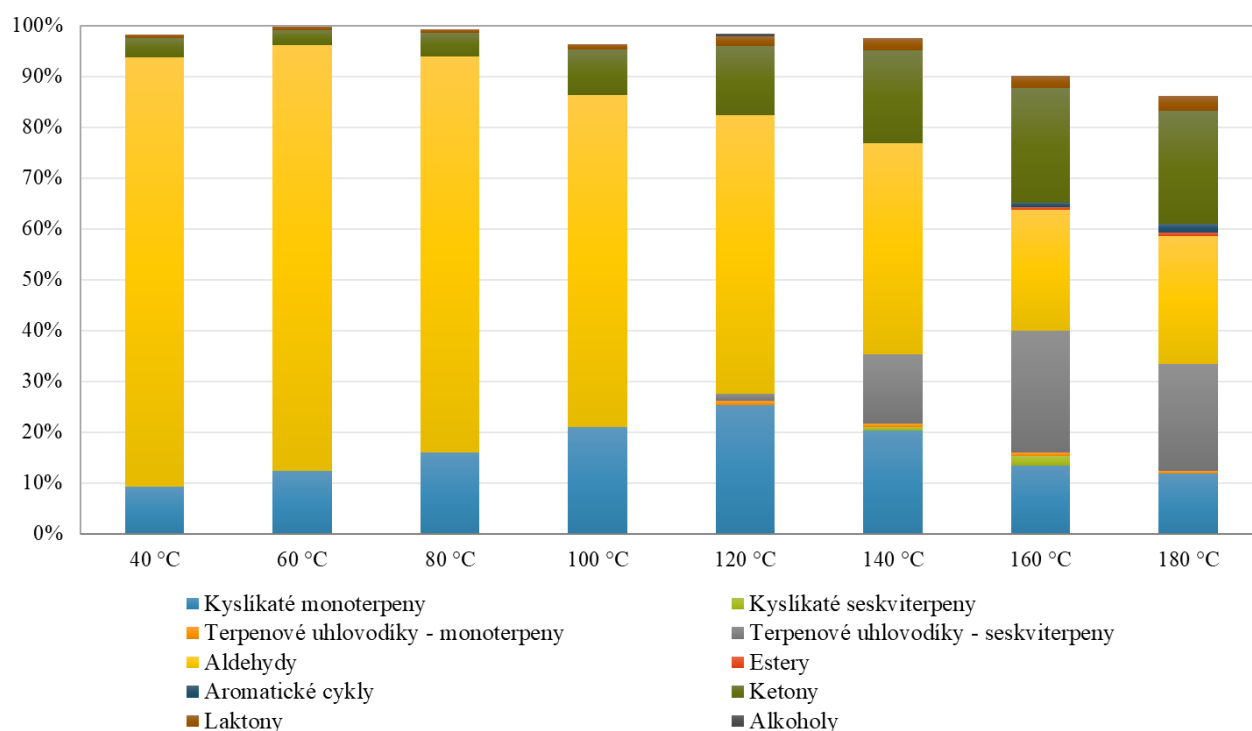
Aldehydy

Počet aldehydů byl v rozmezí od 1 do 6. Nejvýznamnější sloučeninou byl v extraktech identifikován benzaldehyd, který byl zastoupen v každém vzorku ve výrazně vyšší koncentraci než jakákoliv jiná sloučenina, a s teplotou jeho koncentrace klesala. Ve 40 °C tvořil až 84,47 %, dále jeho koncentrace klesala a při 180 °C tvořil 10,85 %. Tento trend je možné vysvětlit tím, že při 180 °C bylo celkově identifikováno přibližně 5x více sloučenin a zároveň mohlo docházet k jeho degradaci. Z Graf 12 lze vyčíst, že relativní obsah aldehydů klesal se zvyšujícím se počtem identifikovaných sloučenin. Benzaldehyd je aromatickou sloučeninou, která má hořkou mandlovou chuť a používá se v chemickém průmyslu na

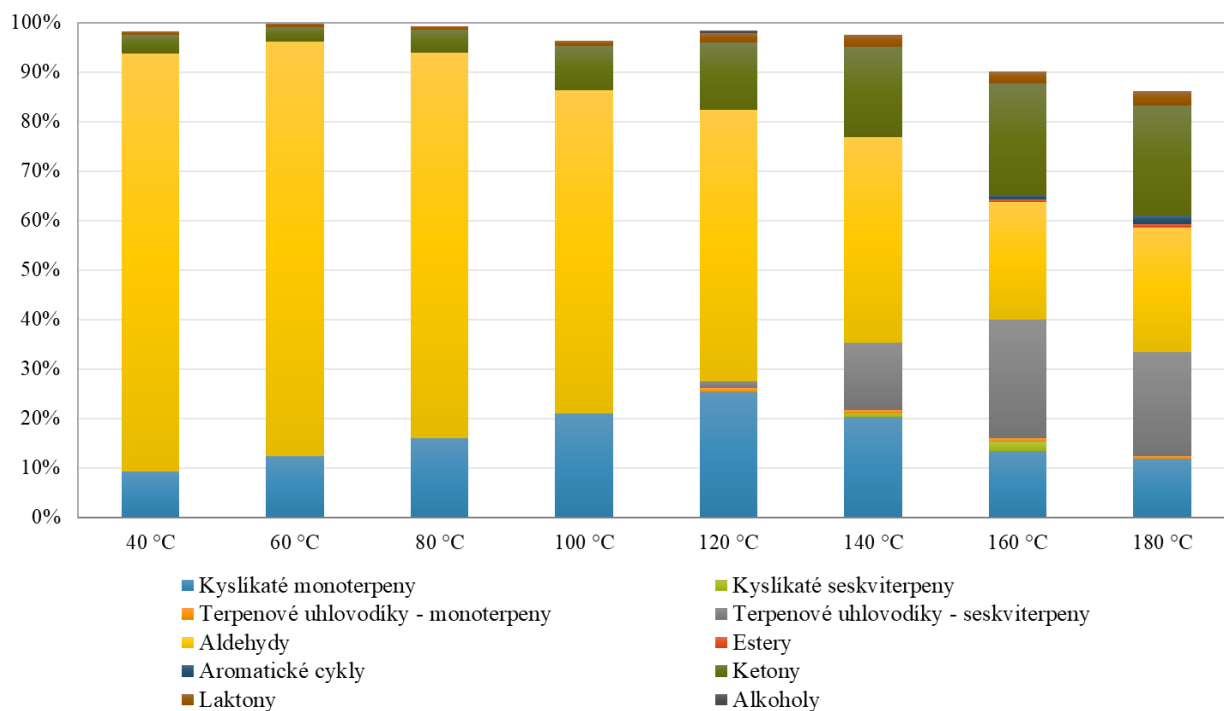
výrobu anilinových barev, parfémů, ochucovadel i jako denaturant v kosmetice [68]. Další identifikované aldehydy byly hexanal a nonanal, přítomné ve všech vzorcích kromě 40 a 80 °C. Heptanal byl identifikován při teplotách 60 °C a 120-160 °C, ve většině vzorků (60-140 °C) se nacházel hexyl cinnamal. Ve dvou nejvyšších teplotách se navíc vyskytoval furfural, který se tvoří Maillardovou reakcí a má velmi pronikavý pach [68]. Ten byl nejspíš jedním z důvodů, proč tyto extrakty voněly po spálenině. Ostatní aldehydy se pak vyskytovaly vždy pouze jednotlivě.

Ketony

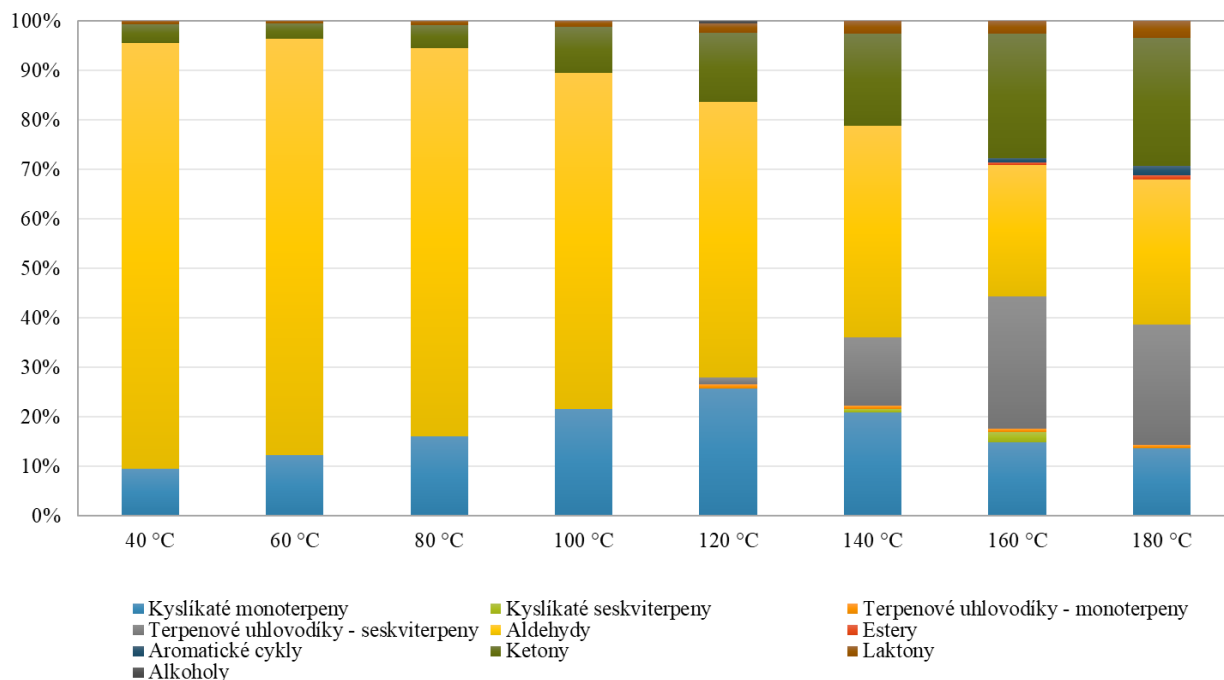
Nárůst ketonů byl z 1 (teploty 40-80 °C) na 2 pro teploty 100-160 °C a pro nejvyšší teplotu byly identifikovány 3 sloučeniny skupiny ketonů. Ketony tvořily v relativním zastoupení skupin od 3 % (60 °C) do necelých 26 % (180 °C). Ve všech vzorcích byl přítomen trans-3-penten-2-on. V teplotě 100 °C byl jako v jediné identifikován tridecan-2-on, od 120 do 180 °C byl identifikován β -ionon. Jako třetí keton byl při teplotě 180 °C identifikován acetylfuran (methylovaný keton). Acetylfuran je sensoricky aktivní sloučenina, kterou lze najít v mnoha ovocných potravinách a nápojích, jako například v alkoholických nápojích, vařených jablkách, hroznovém víně, jahodách a aroma tvoří v mnoha dalších [68]. Jako jediný alkohol byl identifikován mastný alkohol dodecylalkohol v teplotě při 120 °C. Naopak ve všech extraktech byl identifikován lakton dihydro-3-methylen-5-methyl-2-furanon.



Graf 11 Grafické porovnání zastoupení jednotlivých skupin (s obsahem > st) v PHWE extraktech a jejich rozdělení do příslušných skupin.



Graf 13 Obsah jednotlivých identifikovaných skupin v PHWE extraktech při teplotách 40-180 °C (s obsahem > st).



Graf 12 Relativní obsah jednotlivých identifikovaných skupin v PHWE extraktech při teplotách 40-180 °C (s obsahem > st).

4.4. Charakterizace optimálního extraktu

Při metodě PHWE se prokázalo, že se voda za určitých podmínek chová jako rozpouštědlo stejně účinné jako 50% etanol. Využití vody jako levného a „zeleného“ rozpouštědla je velkou výhodou. Na druhou stranu je extrakce pod tlakem náročnější na provedení, do patроны se vejde pouze omezené množství vzorku, příprava je delší a zvětšení objemu procesu je z důvodu požadavku na udržení vysokého tlaku drahý.

Macerace byla při stanovení celkového obsahu polyfenolických látek v rámci směrodatných odchylek srovnatelná s metodou PHWE, navíc je jednoduchá a levná, proto byla vybrána jako vhodnější pro získání „optimálního“ extraktu. Extrakt získaný za podmínek uvedených v kapitole 4.1.2. byl charakterizován z hlediska obsahu polyfenolů, antokyanů a antioxidační aktivity, a těkavých látek.

4.4.1. Celkový obsah polyfenolů, antokyanů a antioxidační aktivity

Celkový obsah bioaktivních látek v bobulích aronie závisí na odrůdě, podmínkách kultivace (půda, vlhkost, sluneční svit a další) a také na typu vzorku – jestli jde o stanovení v čerstvých bobulích, aroniové šťávě, výliscích nebo v sušených bobulích [23], jako v tomto případě. Proto se naměřené hodnoty v různých studiích velmi liší. V následující Tabulka 15 jsou výsledné hodnoty přehledně zaznamenány.

Tabulka 15 Výsledná charakterizace optimálního extraktu, TP – celkový obsah polyfenolických látek, TA – celkový obsah antokyanů, ABTS – celková antioxidační aktivity

TP	1441,56 ± 90 mg/100 g DW
TA	943 ± 8,35 mg/100 g DW
ABTS	24 ± 0,09 μmolTE/g

Celkový obsah polyfenolů

Celkový obsah polyfenolů byl v této práci používán jako rychlá metoda stanovení účinnosti extrakce. Podle článků, které studovaly celkový obsah polyfenolů v sušených bobulích aronie, je jejich koncentrace v rozmezí od 719 do 8192 mg/ 100 g DW. Ke spodní hodnotě došli Jakobek a kol. [19], kteří analyzovali několik druhů bobulovitých plodů a mezi nimi také aronii. Plody byly v čerstvém stavu zmrazené až do samotné analýzy, která byla provedena HPLC. Hudec a kol. [26] stanovili celkovou koncentraci polyfenolických látek na 3760 mg/ 100 g DW, což byl průměr mezi 60 analyzovanými vzorky. Jednu z nejvyšších hodnot zaznamenal Oszmiański a Wojdylo [23], kteří ve výliscích aronie určili až 8192 mg/ 100 g DW, naopak ve šťávě stanovili jako průměrnou koncentraci celkových polyfenolů 1578,79 mg/100 g DW. V našem optimálním extraktu bylo stanoveno celkové množství polyfenolických látek na 1441,56 ± 90 mg/100 g DW (viz Tabulka 15), což je hodnota v rámci koncentrací daných literaturou.

Celkový obsah antokyanů

Celkový obsah antokyanů byl stanoven pomocí pH diferenciální metody. Průměrný obsah antokyanů v aronii je podle Kulling a kol. [2] při vyjádření pro čerstvou váhu (FW) mezi 307-1480 mg/ 100 g a pro suchou váhu (DW) mezi 770-1959 mg/ 100 g. Z toho jmenovitě Hudec

a kol. [26] stanovili průměrný obsah na 641 mg/ 100 g, Jakobek a kol. [19] stanovili celkový obsah antokyanů na 357 mg/ 100 g a Wu a kol. [29] na 1480 mg/ 100 g FW. V našem optimálním extraktu byl celkový obsah antokyanů stanoven na $943 \pm 8,35$ mg/100 g DW (viz Tabulka 15), tato hodnota je v rámci rozmezí hodnot daných literaturou.

Antioxidační aktivita

Antioxidační aktivita byla stanovena pomocí metody používající ABTS. Její výhodou oproti ostatním metodám (DPPH, ORAC a FRAP) je, že je velmi rychlá, může se aplikovat na široké rozpětí pH a analyzuje jak hydrofilní, tak lipofilní sloučeniny. Metoda DPPH je taktéž rychlá, a navíc velmi levná, ale hlavní nevýhodou je, že použití se omezuje pouze na lipofilní antioxidanty a zároveň je omezeno úzkým rozpětím pH. Hlavní nevýhodou ABTS je, že reakce je rychlá, ale zároveň je velmi citlivá na reakční dobu a je nutné každý experiment pečlivě časovat. Jinak může docházet k nepřesným výsledkům. Další nevýhodou je nutnost pracovat v temném prostředí, protože radikál $ABTS^{\bullet+}$ je citlivý na světlo a rychle se rozkládá [25].

V literatuře je antioxidační aktivita zaznamenána v rozmezí 65-70 $\mu\text{molTE/ml}$ v aroniové šťávě [2]. Stanovení pomocí ABTS provedli i Oszmiański a Wojdylo, kteří aktivitu stanovili na 31,4-77,9 $\mu\text{molTE/g}$ [23] a Jakobek a kol. na 79 $\mu\text{molTE/g}$ [19]. V této práci byla antioxidační aktivita pomocí ABTS stanovena na $24 \pm 0,09$ $\mu\text{molTE/g}$. Naše naměřená hodnota je nižší, nejspíš z toho důvodu, že výše zmínění autoři ve svém výzkumu pro extrakci antioxidačních sloučenin použili metanol [19] [23]. Metanol je sice účinnějším extrahovadlem, ale není GRAS (Generally Recognized As Safe) látkou, takže v rámci potravinářského výzkumu není jeho použití možné.

4.4.2. Těkavé látky v optimálním extraktu

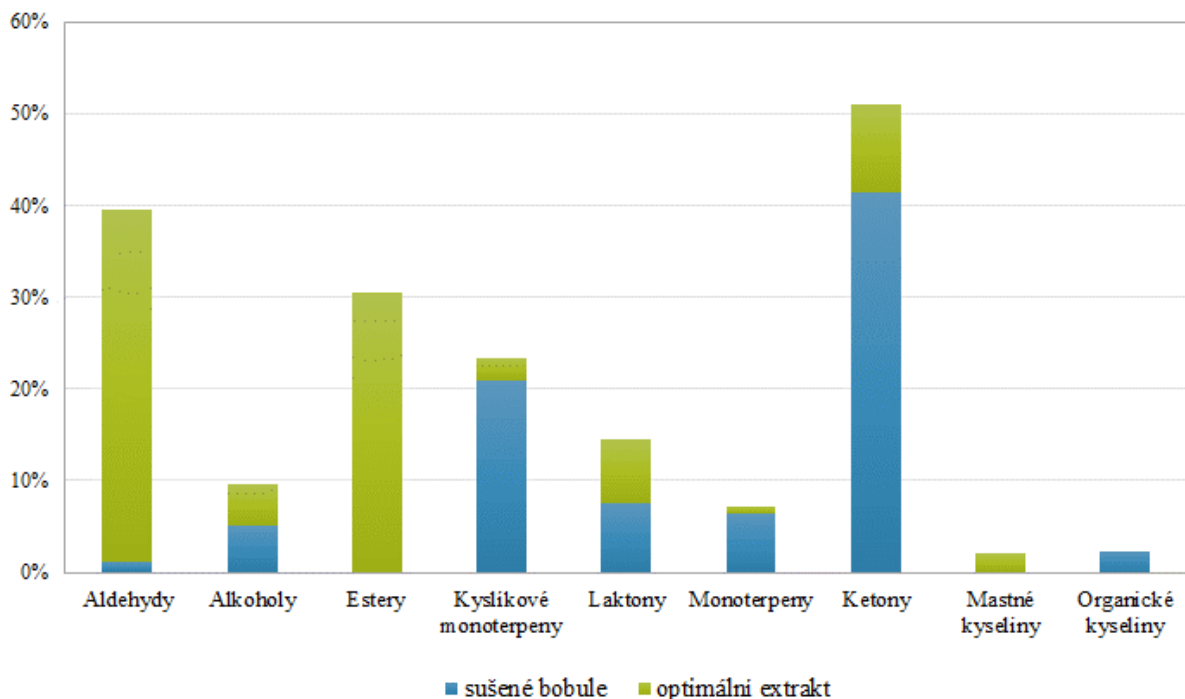
Aronie je velmi aromatická rostlina. V čerstvém stavu má výrazné charakteristické vlastnosti, zejména co se týče chuti. Stejně jako v případě extraktů získaných PHWE, byly i zde sledovány těkavé látky.

Získaný optimální extrakt a sušená aronie, ze které se připravoval, byly analyzovány pomocí HS-SPME-GC-MS. Podmínky analýzy jsou uvedeny v experimentální části (kap. 3.4.4). V optimálním extraktu bylo identifikováno 40 sloučenin, ale pouze 26 s obsahem vyšším než stopové množství ($st < 0,5\%$). V sušených bobulích aronie (SB) bylo identifikováno 50 sloučenin a z nich pouze 16 nad stopové množství. V následující tabulce (Tabulka 16) je optimální extrakt porovnán se sušenou aronií a v Graf 14 je přímě srovnání jednotlivých skupin. Celkově bylo identifikováno 84,94 % obsahu sušených bobulí a 95,19 % optimálního extraktu s obsahem vyšším než stopové množství, tzn. vyšší než 0,5 %. Při porovnání vyšlo, že 5 sloučenin se vyskytuje v obou formách aronie s vyšším obsahem, než je stopové množství. Těmito sloučeninami jsou hexanal, trans-3-penten-2-on, D-limonen, karvon a dihydro-3-methylen-5-methyl-2-furanon.

Tabulka 16 Těživé sloučeniny identifikované v optimálním extraktu a v sušených bobulích aronie, jejich procentuální zastoupení a příslušné retenční časy. Stopové množství (st) < 0,5 %.

RT (min)	sloučenina	optimální extrakt	sušené bobule	skupina
4,12	etanol	-	1,50 %	alkoholy
7,29	hexanal	0,67 %	1,26 %	aldehydy
8,14	2-pentanol	-	0,86 %	alkoholy
8,49	trans-3-penten-2-on	5,48 %	40,73 %	ketony
9,17	dimethyl chloroacetál	0,50 %	-	estery
9,83	methyl hexanoát	21,37 %	-	estery
10,34	D-limonen	0,72 %	1,33 %	monoterpeny
10,57	eukalyptol	-	0,76 %	monoterpeny
13,04	acetoin	-	1,20 %	ketony
11,04	ethyl hexanoát	1,03 %	-	estery
12,52	methyl heptanoát	0,66 %	-	estery
15,24	methyl oktanoát	5,52 %	-	estery
15,98	nonanal	3,06 %	st	aldehydy
16,37	ethyl oktanoát	0,71 %	-	estery
17,25	4-hydroxy-2-pentanon	1,24 %	-	ketony
17,81	kyselina octová	-	2,38 %	organická kyselina
18,02	isomenthon	-	15,18 %	kyslíkové monoterpeny
17,47	furfural	1,47 %	-	aldehydy
17,77	2-ethyl-1-hexanol	2,00 %	-	alkoholy
19,51	(+)-2-bornanon	-	0,64 %	ketony
19,83	benzaldehyd	32,25 %	st	aldehydy
19,93	[R-(R*,R*)]-2,3-butandiol	-	2,77 %	alkoholy
20,03	linalool	-	1,72 %	kyslíkové monoterpeny
21,53	2-methyl-5-(1-methylethenyl)-cyclohexanon	2,17 %	-	ketony
21,65	4-hydroxy-butyrát	0,74 %	-	mastná kyselina
22,51	levomenthol	-	4,51 %	kyslíkové monoterpeny
22,69	butyrolakton	-	1,33 %	laktony
25,11	(-)-karvon	1,93 %	3,58 %	monoterpeny
27,70	dihydro-3-methylene-5-methyl-2-furanon	7,01 %	6,23 %	laktony
26,46	kapronová kyselina	0,70 %	-	mastná kyselina
27,00	benzylalkohol	1,95 %	-	alkoholy
27,73	fenylethanol	0,52 %	st	alkoholy
28,25	β -Ionone	0,74 %	st	ketony
30,79	kyselina kaprylová	0,65 %	-	mastná kyselina
33,02	thymol	0,52 %	-	monoterpeny
36,23	hexyl cinnamal	0,86 %	-	aldehydy

RT (min)	sloučenina	optimální extrakt	sušené bobule	skupina
40,26	decyl dekanóát	0,72 %	-	estery
Celkem		95,19 %	84,94 %	



Graf 14 Grafické porovnání sloučenin v optimálním extraktu a sušených bobulích

Aromatické sloučeniny aronie se tvoří nejen v procesu zrání, ale také enzymatickou degradací základních složek, zejména mastných kyselin [12]. Z toho vychází, že nejvíce zastoupenými sloučeninami byly aldehydy, ketony a estery. Dále degradací mastných kyselin vznikají alkoholy, ty ale dohromady tvořily necelých 10 % všech zastoupených sloučenin (viz Graf 14), nejvíce zastoupeným alkoholem byl 2-ethyl-1-hexanol (2 % v optimálním extraktu) a 2,3-buten-diol (2,77 % v sušených bobulích). Nejvíce byly zastoupeny ketony, sloučeniny trans-3-penten-2-on v sušených bobulích tvořily až 40,73 % a v optimálním extraktu 5,48 %. Dalšími ketony byly acetoin, 2-bornanon, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)-cyklohexanon a β -ionon. Acetoin a 3-penten-2-on byly identifikovány i v práci Kraujalyte a kol. [12]. Estery byly identifikovány pouze v etanolovém extraktu a byly to methyl hexanoát, methyl oktanoát, ethyl hexanoát, ethyl oktanoát, methyl heptanoát a decyl dekanóát. Methyl a ethyl hexanoát byly identifikovány i v práci Kraujalyte a kol. [12].

Aldehydy byly druhou největší skupinou, dohromady jak v extraktu, tak bobulích tvořily téměř 40 % veškerého obsahu. Benzaldehyd je s 3-penten-2-onem stanovován jako hlavní těkavá složka v mnoha studiích, k podobným závěrům došli Kraujalyte a kol. [12], Butorová a kol. [13], Romani a kol. [69] a další. V optimálním extraktu tvořil 32,25 %, ale v sušené

aronii byl pouze ve stopovém množství. Benzaldehyd se v aronii formuje degradací aminokyselin a kyanogenních prekurzorů [12].

Monoterpeny a kyslíkové monoterpeny převažovaly v bobulích aronie. Terpenoidy jsou syntetizovány v rostlině z izoprenoidových jednotek. Prekurzorem monoterpenoidů se zdá být methylethritol [12]. Z monoterpenů tvořily největší část isomenthon (15,18 % v SB) a levomentol (4,51 % v SB), příbuzné sloučeniny mentholu. V obou formách se vysytoval D-limonen a karvon, v optimálním extraktu byl nejvíce právě karvon (1,93 %).

Z ostatních sloučenin byly dále zastoupeny 2 laktony – butyrolakton a dihydro-3-methylene-5-methyl-2-furanon, oba se vyskytovaly v sušených bobulích (6,23 % a 1,29 %), v optimálním extraktu byl pouze druhý jmenovaný v obsahu 7,01 %. a na závěr byla v optimálním extraktu jedna mastná kyselina – kyselina kaprylová a v sušených bobulích kyselina octová. Kyselina octová byla také identifikována v práci Kraujalyte a kol. [12].

5. ZÁVĚR

Hlavním cílem této práce bylo nalézt optimální metodu extrakce sušené aronie a výsledný extrakt komplexně charakterizovat. Vzorek aronie byl zakoupen z běžného internetového obchodu. Optimalizace byla založena na maximální extrakci bioaktivních sloučenin – polyfenolů a charakterizace navíc zahrnovala celkový obsah antokyanových barviv, stanovení antioxidační aktivity a těkavých látek.

Při výběru typu extrakce byly srovnány metody klasické macerace a moderní techniky PHWE. Pro získání optimálního extraktu byla vybrána macerace, protože její účinnost v rámci extrakce polyfenolických látek byla srovnatelná s PHWE a zároveň byla výhodnější hlavně z pohledu jednoduchosti a ceny. Při maceraci není potřeba speciálního zařízení, vzorky se velmi snadno připravují a lze ji provést prakticky v jakékoliv laboratoři i příp. v praktickém provozu. Výhodou PHWE je, že doba extrakce je výrazně nižší a jako rozpouštědlo se osvědčila čistá voda jako srovnatelná s 50 % etanolem.

Metoda PHWE byla provedena na Ústavu analytické chemie AV ČR v Brně. Extrakce pomocí PHWE byla dále využita pro identifikaci těkavých látek extrahovaných při teplotách 40-180 °C. Počet identifikovaných látek stoupal se zvyšující se teplotou. Při všech teplotách byly identifikovány trans-3-penten-2-on, nonanal, isomenthon, benzaldehyd, p-menthan-1-ol, estragol, L-karvon, dihydro-3-methylen-5-methyl-2-furanon a hexyl cinnamal. Jako ideální podmínky pro PHWE extrakci byla stanovena teplota 120 °C, navážka 0,5 g (do 11 ml patrony) a extrakce v pouze jednom cyklu.

Podmínky macerace byly navrženy statistickou metodou plánovaného experimentu. Výstupem tohoto experimentu bylo, že žádný ze zkoumaných faktorů (navážka, rozpouštědlo, doba extrakce a teplota) nemá samostatně ani v kombinaci statisticky významný vliv na účinnost extrakce. Jako optimální podmínky byly vybrány ty, které v DOE vyšly s největším výnosem celkových polyfenolů, tj. navážka 10 g/ 50 ml, teplota 30 °C, rozpouštědlo 50% etanol, doba extrakce 30 minut. Obsah polyfenolů v takto získaném extraktu byl stanoven na $1441,56 \pm 90$ mg/100 g DW, dále byl v extraktu stanoven celkový obsah antokyanů pomocí pH diferenciální metody na $943 \pm 8,35$ mg/100 g DW. Tyto hodnoty se shodovaly se studovanou literaturou. Antioxidační aktivita byla v extraktu stanovena pomocí metody ABTS na $24 \pm 0,09$ μ molTE/g, tato hodnota byla nižší než v literatuře, možným důvodem je použití jiného rozpouštědla. Na závěr byly v extraktu a sušených bobulích stanoveny těkavé látky, ze kterých v optimálním extraktu největší množství tvořil methyl hexanoát a benzaldehyd.

Vzhledem k tomu, že žádný z faktorů, zkoumaných v této práci, neměl podle DOE významný vliv na účinnost extrakce, v navazujících experimentech bude zkoumán vliv dalších faktorů, např. čerstvý materiál, velikost částic aj.

6. Použitá literatura

- [1] KOKOTKIEWICZ, Adam, Zbigniew JAREMICZ a Maria LUCZKIEWICZ. Aronia Plants: A Review of Traditional Use, Biological Activities, and Perspectives for Modern Medicine. *Journal of Medicinal Food* [online]. 2010, **13**(2), 255-269 [cit. 2020-06-22]. DOI: 10.1089/jmf.2009.0062. ISSN 1096-620X. Dostupné z: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/jmf.2009.0062>
- [2] KULLING, Sabine a Harshadai RAWEL. Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) – A Review on the Characteristic Components and Potential Health Effects. *Planta Medica* [online]. 2008, **74**(13), 1625-1634 [cit. 2020-06-22]. DOI: 10.1055/s-0028-1088306. ISSN 0032-0943. Dostupné z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0028-1088306>
- [3] ARONIA MELANOCARPA 'GARLICJANKA' / TEMNOPLODEC ČERNOPLODÝ, K11. *Rostlinky.cz* [online]. 2020 [cit. 2020-06-25]. Dostupné z: <https://www.rostlinky.cz/aronia-melanocarpa-garlicjanka-aronia-ciernoploda-k11.html>
- [4] SINHA, Nirmal K. a Jiwan S. SIDHU, ed. *Handbook of Fruits and Fruit Processing* [online]. Second Edition. New Delhi, India: John Wiley & Sons, Ltd., 2012 [cit. 2020-06-25]. ISBN 9781118352533. Dostupné z: shorturl.at/afxBG
- [5] NAWIRSKA, Agnieszka a Monika KWAŚNIEWSKA. Dietary fibre fractions from fruit and vegetable processing waste. *Food Chemistry* [online]. 2005, **91**(2), 221-225 [cit. 2020-07-21]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2003.10.005. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814603005314>
- [6] ČERVENKA, L. MOISTURE ADSORPTION CHARACTERISTICS OF BLACK CURRANT (*RIBES NIGRUM* L.), BLACK ELDERBERRY (*SAMBUCUS NIGRA* L.) AND CHOKEBERRY (*ARONIA MELANOCARPA*, [MINCHX.] ELL.) SAMPLES AT DIFFERENT TEMPERATURES. *Journal of Food Process Engineering* [online]. 2011, **34**(5), 1419-1434 [cit. 2020-06-26]. DOI: 10.1111/j.1745-4530.2009.00507.x. ISSN 01458876. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1745-4530.2009.00507.x>
- [7] SIDOR a GRAMZA-MICHAŁOWSKA. Black Chokeberry *Aronia melanocarpa* L.—A Qualitative Composition, Phenolic Profile and Antioxidant Potential. *Molecules* [online]. 2019b, **24**(20) [cit. 2020-06-26]. DOI: 10.3390/molecules24203710. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/20/3710>
- [8] TANAKA, Tsuneo a Akira TANAKA. Chemical Components and Characteristics of Black Chokeberry. *NIPPON SHOKUHIN KAGAKU KOGAKU KAISHI* [online]. 2001, **48**(8), 606-610 [cit. 2020-06-26]. DOI: 10.3136/nskkk.48.606. ISSN 1341-027X. Dostupné z: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.Journalarchive/nskkk1995/48.606?from=CrossRef>
- [9] SÁDECKÁ, Jana. Prínos GC-olfaktometrie v analýze prírodných aróm. (Benefits of gas-chromatography- olfactometry in the analysis of natural aromas.). *Potravinárstvo* [online]. 2013, **7**(0), 204-208 [cit. 2020-07-21]. Dostupné z:

- http://www.potravinarstvo.com/dokumenty/mc_march_2013/bezpecnost_potravin_rastlinn_eho_povodu/sadecka.pdf
- [10] VONÁŠEK, F., E. TREPKOVÁ a L. NOVOTNÝ. *Látky vonné a chuťové*. [online]. Praha 11: SNTL – Nakladatelství technické literatury, 1987 [cit. 2020-07-21]. Dostupné z: http://www.potravinarstvo.com/dokumenty/mc_march_2013/bezpecnost_potravin_rastlinn_eho_povodu/sadecka.pdf
- [11] BUTOROVÁ, L. *Charakterizace plodů aronie (Aronia melanocarpa) a muchovníků (Amelanchier alnifolia)*. Brno, 2014, 103 s. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Ing. Eva Vítová, Ph.D.
- [12] KRAUJALYTÈ, Vilma, Erich LEITNER a Petras Rimantas VENSKUTONIS. Characterization of Aronia melanocarpa Volatiles by Headspace-Solid-Phase Microextraction (HS-SPME), Simultaneous Distillation/Extraction (SDE), and Gas Chromatography-Olfactometry (GC-O) Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2013, **61**(20), 4728-4736 [cit. 2020-06-26]. DOI: 10.1021/jf400152x. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf400152x>
- [13] BURDĚJOVÁ, Lenka, Eva VÍTOVÁ a Martin POLOVKA. Comparison of volatiles identified in Aronia melanocarpa and Amelanchier alnifolia using solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of food and nutrition research* [online]. 2016, **55**(1), 57–68 [cit. 2020-07-20]. ISSN 1336-8672. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/298710275_Comparison_of_volatiles_identified_in_Aronia_melanocarpa_and_Amelanchier_alnifolia_using_solid-phase_microextraction_coupled_to_gas_chromatography-mass_spectrometry
- [14] HIRVI, Timo a Erkki HONKANEN. Analysis of the volatile constituents of black chokeberry (Aronia melanocarpa Ell.). *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 1985, **36**(9), 808-810 [cit. 2020-07-21]. DOI: 10.1002/jsfa.2740360908. ISSN 00225142. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.2740360908>
- [15] PANDEY, Kanti Bhooshan a Syed Ibrahim RIZVI. Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [online]. 2009, **2**(5), 270-278 [cit. 2020-06-25]. DOI: 10.4161/oxim.2.5.9498. ISSN 1942-0900. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/omcl/2009/897484/>
- [16] AZMIR, J., I.S.M. ZAIDUL, M.M. RAHMAN et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering* [online]. 2013, **117**(4), 426-436 [cit. 2020-06-29]. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014. ISSN 02608774. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877413000277>
- [17] ZUITER, A.S. Proanthocyanidin: Chemistry and Biology. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering* [online]. Elsevier, 2014, , 270–278 [cit. 2020-06-29]. DOI: 10.1016/B978-0-12-409547-2.11046-7. ISBN 9780124095472.

Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124095472110467>

- [18] SIDOR, Andrzej, Agnieszka DROŻDŻYŃSKA a Anna GRAMZA-MICHAŁOWSKA. Black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) and its products as potential health-promoting factors - An overview. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2019a, **89**, 45-60 [cit. 2020-06-22]. DOI: 10.1016/j.tifs.2019.05.006. ISSN 09242244. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224418301699>
- [19] JAKOBEK, Lidija, Marijan ŠERUGA, Ivana NOVAK a Martina MEDVIDOVIĆ-KOSANOVIĆ. Flavonols, Phenolic Acids and Antioxidant Activity of Some Red Fruits. *Deulsche Lebensmittel-Run* [online]. 2007, **103**(8), 369-378 [cit. 2020-07-19]. Dostupné z: https://bib.irb.hr/datoteka/321086.Jakobek.L._DLR_10382007_369-378.PDF
- [20] ČUJIĆ, Nada, Katarina ŠAVIKIN, Teodora JANKOVIĆ, Dejan PLJEVLJAKUŠIĆ, Gordana ZDUNIĆ a Svetlana IBRIĆ. Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. *Food Chemistry* [online]. 2016, **194**, 135-142 [cit. 2020-07-13]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.08.008. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814615011917>
- [21] RAMIĆ, Milica, Senka VIDOVIĆ, Zoran ZEKOVIĆ, Jelena VLADIĆ, Aleksandra CVEJIN a Branimir PAVLIĆ. Modeling and optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenolic compounds from *Aronia melanocarpa* by-products from filter-tea factory. *Ultrasonics Sonochemistry* [online]. 2015, **23**, 360-368 [cit. 2020-06-30]. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2014.10.002. ISSN 13504177. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1350417714003083>
- [22] KOZUKA, Miyuki, Takuya YAMANE, Momoko IMAI et al. Isolation of HMG-CoA reductase inhibitors from aronia juice. *Food Bioscience* [online]. 2020, **34** [cit. 2020-07-21]. DOI: 10.1016/j.fbio.2020.100535. ISSN 22124292. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212429219302792>
- [23] OSZMIAŃSKI, Jan a Aneta WOJDYŁO. *Aronia melanocarpa* phenolics and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology* [online]. 2005, **221**(6), 809-813 [cit. 2020-06-29]. DOI: 10.1007/s00217-005-0002-5. ISSN 1438-2377. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00217-005-0002-5>
- [24] KHOO, Hock Eng, Azrina AZLAN, Sou Teng TANG a See Meng LIM. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & Nutrition Research* [online]. 2017, **61**(1) [cit. 2020-06-25]. DOI: 10.1080/16546628.2017.1361779. ISSN 1654-6628. Dostupné z: <http://foodandnutritionresearch.net/index.php/fnr/article/view/1257>
- [25] HIDALGO, Gábor-Indra a María ALMAJANO. Red Fruits: Extraction of Antioxidants, Phenolic Content, and Radical Scavenging Determination. *Antioxidants* [online]. 2017, **6**(1) [cit. 2020-06-22]. DOI: 10.3390/antiox6010007. ISSN 2076-3921. Dostupné z:

<http://www.mdpi.com/2076-3921/6/1/7>

- [26] HUDEC, Jozef, Dušan BAKOŠ, Dušan MRAVEC, L'ubomír KOBIDA, Maria BURDOVÁ, Ivan TURIANICA a Jaroslav HLUŠEK. Content of Phenolic Compounds and Free Polyamines in Black Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) after Application of Polyamine Biosynthesis Regulators. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2006, **54**(10), 3625-3628 [cit. 2020-07-19]. DOI: 10.1021/jf060299q. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf060299q>
- [27] LANKTREE, Matthew B. a Robert A. HEGELE. Metabolic Syndrome. *Genomic and Precision Medicine* [online]. Third edition. Elsevier, 2018, s. 47-63 [cit. 2020-06-22]. DOI: 10.1016/B978-0-12-801812-5.00015-9. ISBN 9780128018125. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128018125000159>
- [28] ZHENG, Wei a Shioh Y. WANG. Oxygen Radical Absorbing Capacity of Phenolics in Blueberries, Cranberries, Chokeberries, and Lingonberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2003, **51**(2), 502-509 [cit. 2020-06-30]. DOI: 10.1021/jf020728u. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf020728u>
- [29] WU, Xianli, Liwei GU, Ronald L. PRIOR a Steve MCKAY. Characterization of Anthocyanins and Proanthocyanidins in Some Cultivars of Ribes , Aronia , and Sambucus and Their Antioxidant Capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2004, **52**(26), 7846-7856 [cit. 2020-06-30]. DOI: 10.1021/jf0486850. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf0486850>
- [30] MOYER, Richard A., Kim E. HUMMER, Chad E. FINN, Balz FREI a Ronald E. WROLSTAD. Anthocyanins, Phenolics, and Antioxidant Capacity in Diverse Small Fruits: Vaccinium , Rubus , and Ribes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2002, **50**(3), 519-525 [cit. 2020-06-30]. DOI: 10.1021/jf011062r. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf011062r>
- [31] SKOCZYŃSKA, Anna a Iwona JĘDRYCHOWSKA. Influence of chokeberry juice on arterial blood pressure and lipid parameters in men with mild hypercholesterolemia. *Pharmacol Rep* [online]. 2007, (59), 177-182 [cit. 2020-07-29]. Dostupné z: http://ifpan.krakow.pl/pjp/pdf/2007/s1_177.pdf
- [32] MALIK, Minnie, Cuiwei ZHAO, Norberta SCHOENE, M. Monica GUISTI, Mary P. MOYER a Bernadene A. MAGNUSON. Anthocyanin-Rich Extract From Aronia melanocarpa E. Induces a Cell Cycle Block in Colon Cancer but Not Normal Colonic Cells. *Nutrition and Cancer* [online]. 2003, **46**(2), 186-196 [cit. 2020-07-29]. DOI: 10.1207/S15327914NC4602_12. ISSN 0163-5581. Dostupné z: http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1207/S15327914NC4602_12
- [33] JING, Pu, Joshua A. BOMSER, Steven J. SCHWARTZ, Jian HE, Bernadene A. MAGNUSON a M. Mónica GIUSTI. Structure–Function Relationships of Anthocyanins

- from Various Anthocyanin-Rich Extracts on the Inhibition of Colon Cancer Cell Growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2008, **56**(20), 9391-9398 [cit. 2020-07-29]. DOI: 10.1021/jf8005917. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf8005917>
- [34] VALCHEVA-KUZMANOVA, S. V. a Anna BELCHEVA. Current knowledge of Aronia melanocarpa as a medicinal plant. *Folia medica* [online]. 2006, **48**(2), 11-17 [cit. 2020-07-21]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17408071/>
- [35] HERNANDEZ, Y, M LOBO a M GONZALEZ. Factors affecting sample extraction in the liquid chromatographic determination of organic acids in papaya and pineapple. *Food Chemistry* [online]. 2009, **114**(2), 734-741 [cit. 2020-07-02]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.10.021. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814608012363>
- [36] ZYGLER, A., M. SIOMIŃSKA a J. NAMIEŚNIK. Soxhlet Extraction and New Developments Such as Soxtec. *Comprehensive Sampling and Sample Preparation* [online]. Elsevier, 2012, **2**, 65-82 [cit. 2020-07-02]. DOI: 10.1016/B978-0-12-381373-2.00037-5. ISBN 9780123813749. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123813732000375>
- [37] AZWANIDA, NN. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicinal & Aromatic Plants* [online]. 2015, **04**(03), 426-436 [cit. 2020-07-02]. DOI: 10.4172/2167-0412.1000196. ISSN 21670412. Dostupné z: <http://www.omicsgroup.org/journals/a-review-on-the-extraction-methods-use-in-medicinal-plants-principle-strength-and-limitation-2167-0412-1000196.php?aid=58448>
- [38] *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants* [online]. 1. Italy: United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology, 2008 [cit. 2020-07-02]. Dostupné z: https://www.unido.org/sites/default/files/2009-10/Extraction_technologies_for_medicinal_and_aromatic_plants_0.pdf
- [39] VANKAR, Padma S. Essential oils and fragrances from natural sources. *Resonance* [online]. 2004, **9**(4), 30-41 [cit. 2020-07-02]. DOI: 10.1007/BF02834854. ISSN 0971-8044. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02834854>
- [40] SILVA, L.V., D.L. NELSON, M.F.B. DRUMMOND, L. DUFOSSÉ a M.B.A. GLÓRIA. Comparison of hydrodistillation methods for the deodorization of turmeric. *Food Research International* [online]. 2005, **38**(8-9), 1087-1096 [cit. 2020-07-02]. DOI: 10.1016/j.foodres.2005.02.025. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996905001213>
- [41] TEO, Chin Chye, Swee Ngin TAN, Jean Wan Hong YONG, Choy Sin HEW a Eng Shi ONG. Pressurized hot water extraction (PHWE). *Journal of Chromatography A* [online]. 2010, **1217**(16), 2484-2494 [cit. 2020-07-02]. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.12.050. ISSN

00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967309019001>
- [42] PLAZA, Merichel a Charlotta TURNER. Pressurized hot water extraction of bioactives. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2015, **71**, 39-54 [cit. 2020-07-05]. DOI: 10.1016/j.trac.2015.02.022. ISSN 01659936. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993615001363>
- [43] AMEER, Kashif, Hafiz Muhammad SHAHBAZ a Joong-Ho KWON. Green Extraction Methods for Polyphenols from Plant Matrices and Their Byproducts: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. 2017, **16**(2), 295-315 [cit. 2020-07-05]. DOI: 10.1111/1541-4337.12253. ISSN 15414337. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/1541-4337.12253>
- [44] ARAPITSAS, Panagiotis a Charlotta TURNER. Pressurized solvent extraction and monolithic column-HPLC/DAD analysis of anthocyanins in red cabbage. *Talanta* [online]. 2008, **74**(5), 1218-1223 [cit. 2020-07-05]. DOI: 10.1016/j.talanta.2007.08.029. ISSN 00399140. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914007005863>
- [45] MARINO, Dale J., Harvey J. CLEWELL, P. Robinan GENTRY, Tammie R. COVINGTON, C. Eric HACK, Raymond M. DAVID a David A. MORGOTT. Revised assessment of cancer risk to dichloromethane: Part I Bayesian PBPK and dose–response modeling in mice. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* [online]. 2006, **45**(1), 44-54 [cit. 2020-07-05]. DOI: 10.1016/j.yrtph.2005.12.007. ISSN 02732300. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0273230005002126>
- [46] PIÑEIRO, Zulema, Miguel PALMA a Carmelo G BARROSO. Determination of catechins by means of extraction with pressurized liquids. *Journal of Chromatography A* [online]. 2004, **1026**(1-2), 19-23 [cit. 2020-07-05]. DOI: 10.1016/j.chroma.2003.10.096. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196730301971X>
- [47] KIM, Jong-Wan, Tatsuya NAGAOKA, Yasuyuki ISHIDA, Tatsuya HASEGAWA, Kuniyuki KITAGAWA a Seung-Cheol LEE. Subcritical Water Extraction of Nutraceutical Compounds from Citrus Pomaces. *Separation Science and Technology* [online]. 2009, **44**(11), 2598-2608 [cit. 2020-07-05]. DOI: 10.1080/01496390903014375. ISSN 0149-6395. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01496390903014375>
- [48] BRAZDAUSKAS, T., L. MONTERO, P.R. VENSKUTONIS, E. IBAÑEZ a M. HERRERO. Downstream valorization and comprehensive two-dimensional liquid chromatography-based chemical characterization of bioactives from black chokeberries (*Aronia melanocarpa*) pomace. *Journal of Chromatography A* [online]. 2016, **1468**, 126-135 [cit. 2020-07-22]. DOI: 10.1016/j.chroma.2016.09.033. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967316312341>
- [49] SÁNCHEZ-RANGEL, Juan Carlos, Jorge BENAVIDES, J. Basilio HEREDIA, Luis CISNEROS-ZEVALLOS a Daniel A. JACOBO-VELÁZQUEZ. The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination.

- Analytical Methods* [online]. 2013, **5**(21), 5990–5999 [cit. 2020-07-02]. DOI: 10.1039/c3ay41125g. ISSN 1759-9660. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3ay41125g>
- [50] LEE, Jungmin, Robert W DURST, Ronald E WROLSTAD et al. Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* [online]. 2005, **88**(5), 1269-1278 [cit. 2020-07-02]. DOI: 10.1093/jaoac/88.5.1269. ISSN 1060-3271. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jaoac/article/88/5/1269-1278/5657437>
- [51] PAULOVÁ, Hana, Hana BOCHOŘÁKOVÁ a TÁBORSKÁ TÁBORSKÁ. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické listy, Praha, ČR: Česká společnost chemická* [online]. Praha, ČR: Česká společnost chemická, 2004, **98**(4), 174-179 [cit. 2020-07-03]. ISSN 0009-2770. Dostupné z: http://chemicke-listy.cz/docs/full/2004_04_03.pdf
- [52] PRIOR, Ronald L., Xianli WU a Karen SCHAICH. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2005, **53**(10), 4290-4302 [cit. 2020-07-02]. DOI: 10.1021/jf0502698. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf0502698>
- [53] TOMOVSKA, R., A. AGIRRE, A. VELOSO a J.R. LEIZA. Characterization Techniques for Polymeric Materials. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering* [online]. Elsevier, 2014 [cit. 2020-07-03]. DOI: 10.1016/B978-0-12-409547-2.10910-2. ISBN 9780124095472. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124095472109102>
- [54] WANG, Huaiyu a Paul K. CHU. Surface Characterization of Biomaterials. *Characterization of Biomaterials* [online]. Elsevier, 2013, , 105-174 [cit. 2020-07-03]. DOI: 10.1016/B978-0-12-415800-9.00004-8. ISBN 9780124158009. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124158009000048>
- [55] KATAOKA, Hiroyuki. Sample preparation for liquid chromatography. *Liquid Chromatography* [online]. Elsevier, 2017, , 1-37 [cit. 2020-07-07]. DOI: 10.1016/B978-0-12-805392-8.00001-3. ISBN 9780128053928. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128053928000013>
- [56] *SPME for GC Analysis: Getting Started with Solid Phase Microextraction*. Germany, 2020. Dostupné také z: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma-Aldrich/Brochure/1/solid-phase-microextraction-for-gc-mk.pdf>
- [57] FORGÁCS, E. a T. CSERHÁTI. CHROMATOGRAPHY | Principles. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* [online]. Second Edition. Budapest, Hungary: Elsevier, 2003, s. 1259-1267 [cit. 2020-07-07]. DOI: 10.1016/B0-12-227055-X/00230-3. ISBN

9780122270550. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B012227055X002303>
- [58] NOVOTNY, Milos. Gas Chromatography. *Encyclopedia of Physical Science and Technology* [online]. Third Edition. Indiana, USA: Elsevier, 2003, s. 455-472 [cit. 2020-07-07]. DOI: 10.1016/B0-12-227410-5/00275-1. ISBN 9780122274107. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B0122274105002751>
- [59] HOLČAPEK, Michal. *Spojení hmotnostní spektrometrie a separačních technik* [online]. In: . 2016 [cit. 2020-07-21]. Dostupné z:
https://holcapek.upce.cz/teaching/09_Spojeni_MS_separace.pdf
- [60] *Helena Vlčková* [online]. Braniškov, ČR, 2019 [cit. 2020-07-08]. Dostupné z:
<https://bylinyacaje.webnode.cz>
- [61] SILVA, E., H. ROGEZ a Y. LARONDELLE. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Separation and Purification Technology* [online]. 2007, **55**(3), 381-387 [cit. 2020-07-14]. DOI: 10.1016/j.seppur.2007.01.008. ISSN 13835866. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383586607000512>
- [62] MOLDOVAN, , IURIAN, PUSCAS et al. A Design of Experiments Strategy to Enhance the Recovery of Polyphenolic Compounds from *Vitis vinifera* By-Products through Heat Reflux Extraction. *Biomolecules* [online]. 2019, **9**(10) [cit. 2020-07-14]. DOI: 10.3390/biom9100529. ISSN 2218-273X. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2218-273X/9/10/529>
- [63] MELOUN, Milan a Jiří MILITKÝ. *Kompendium statistického zpracování dat: metody a řešené úlohy*. Vyd. 2., přeprac. a rozš. Praha: Academia, 2006. ISBN 80-200-1396-2.
- [64] PLAZA, Merichel, Victor ABRAHAMSSON a Charlotta TURNER. Extraction and Neof ormation of Antioxidant Compounds by Pressurized Hot Water Extraction from Apple Byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2013, **61**(23), 5500-5510 [cit. 2020-07-17]. DOI: 10.1021/jf400584f. ISSN 0021-8561. Dostupné z:
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf400584f>
- [65] PLAZA, Merichel, Miryam AMIGO-BENAVENT, María D. DEL CASTILLO, Elena IBÁÑEZ a Miguel HERRERO. Facts about the formation of new antioxidants in natural samples after subcritical water extraction. *Food Research International* [online]. 2010, **43**(10), 2341-2348 [cit. 2020-07-27]. DOI: 10.1016/j.foodres.2010.07.036. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996910002668>
- [66] MONRAD, Jeana, Luke HOWARD, Jerry KING, Keerthi SRINIVAS a Andy MAUROMOUSTAKOS. Subcritical Solvent Extraction of Anthocyanins from Dried Red Grape Pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2010, **58**(5), 2862-2868 [cit. 2020-07-17]. DOI: 10.1021/jf904087n. ISSN 0021-8561. Dostupné z:

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf904087n>

- [67] MONRAD, Jeana, Manuel SUÁREZ, Maria MOTILVA, Jerry KING, Keerthi SRINIVAS a Luke HOWARD. Extraction of anthocyanins and flavan-3-ols from red grape pomace continuously by coupling hot water extraction with a modified expeller. *Food Research International* [online]. 2014, **65**, 77-87 [cit. 2020-07-17]. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.04.020. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996914002695>
- [68] PubChem Database. *National Center for Biotechnology Information* [online]. USA [cit. 2020-07-20]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
- [69] ROMANI, Annalisa, Pamela VIGNOLINI, Francesca IERI a Daniela HEIMLER. Polyphenols and Volatile Compounds in Commercial Chokeberry (*Aronia Melanocarpa*) Products. *Natural Product Communications* [online]. 2016, **11**(1) [cit. 2020-07-20]. DOI: 10.1177/1934578X1601100129. ISSN 1934-578X. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1934578X1601100129>
- [70] Dětská 100% šťáva jablíčko s aronií. In: *LEROS* [online]. 2020 [cit. 2020-06-30]. Dostupné z: <https://www.leros.cz/detska-100-stava-jablicko-s-aronii>
- [71] Sirup aronie: Aronie – černá jeřabina s mocnými účinky. In: *LEROS* [online]. 2020 [cit. 2020-06-30]. Dostupné z: <https://www.leros.cz/sirup-aronie>
- [72] Soxhlet extractor. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001 [cit. 2020-07-02]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Soxhlet_extractor
- [73] OSMAN, A.M., K.K.Y. WONG a A. FERNYHOUGH. ABTS radical-driven oxidation of polyphenols: Isolation and structural elucidation of covalent adducts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2006, **346**(1), 321-329 [cit. 2020-07-03]. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.05.118. ISSN 0006291X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X06011946>
- [74] PÓL, Jaroslav, Elena VARAĐOVÁ OSTRÁ, Pavel KARÁSEK, Michal ROTH, Karolínka BENEŠOVÁ, Pavla KOTLAŘÍKOVÁ a Josef ČÁSLAVSKÝ. Comparison of two different solvents employed for pressurised fluid extraction of stevioside from *Stevia rebaudiana*: methanol versus water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2007, **388**(8), 1847-1857 [cit. 2020-07-03]. DOI: 10.1007/s00216-007-1404-y. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-007-1404-y>
- [75] KIM, Il-Young, Sang-Hoon SUH, In-Kyu LEE a Robert R WOLFE. Applications of stable, nonradioactive isotope tracers in in vivo human metabolic research. *Experimental and Molecular Medicine* [online]. 2016, **48**(1), 203-203 [cit. 2020-07-29]. DOI: 10.1038/emm.2015.97. ISSN 2092-6413. Dostupné z:

<http://www.nature.com/articles/emm201597>

- [76] SCHMIDT, Kamila a Ian PODMORE. Current Challenges in Volatile Organic Compounds Analysis as Potential Biomarkers of Cancer. *Journal of Biomarkers* [online]. 2015, **2015**, 1-16 [cit. 2020-07-29]. DOI: 10.1155/2015/981458. ISSN 2090-8660. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/archive/2015/981458/>

7. POUŽITÉ ZKRATKY

ABTS – 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)

DPPH – 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical

DW – dry weight, suchá váha

FW – fresh weight, čerstvá váha

GA – gallic acid, kyselina gallová

GAE – gallic acid equivalents, ekvivalent kyseliny gallové

GRAS – Generally Recognised As Safe, Všeobecně považován za bezpečný

HPLC – high performance liquid chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie

MS – mass spectrometry, hmotnostní spektrometrie

ORAC – oxygen radical absorbance capacity, kapacita zhášení kyslíkového radikálu

PLE – pressurized liquid extraction, extrakce tlakovanou kapalinou

SFE – supercritical fluid extraction, superkritická fluidní extrakce

TA – total anthocyanin content, celkový obsah antokyaninů

TEAC – Trolox equivalent antioxidant capacity, ekvivalent antioxidační kapacity Troloxu

TE – Trolox equivalent, ekvivalent Troloxu

TP – total phenolic content, celkový obsah polyfenolů

UAE – ultrasound assisted extraction, ultrazvuková extrakce

8. PŘÍLOHY

Příloha 1 Chromatogram těkavých látek v PHWE extraktu při teplotě 180 °C; identifikace sloučenin viz Tabulka 14.

