

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

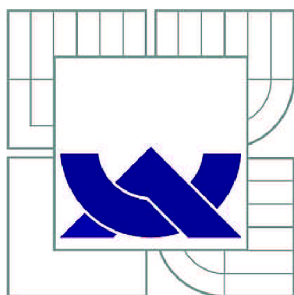
SROVNÁNÍ NĚKTERÝCH NOVÝCH ODRŮD RYBÍZŮ Z HLEDISKA
VYBRANÝCH OBSAHOVÝCH LÁTEK

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. LEONA MARKOVÁ

BRNO 2013



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

SROVNÁNÍ NĚKTERÝCH NOVÝCH ODRŮD RYBÍZŮ Z HLEDISKA VYBRANÝCH OBSAHOVÝCH LÁTEK

COMPARISON OF SOME NEW CURRANT VARIETIES BASED ON THE CONTENT OF
SELECTED BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

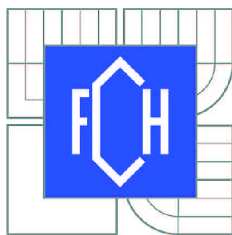
Bc. LEONA MARKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. MILENA VESPALCOVÁ, Ph.D.

BRNO 2013



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0746/2012	Akademický rok: 2012/2013
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Leona Marková	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.	
Konzultanti:	Ing. Aleš Matějček, Ph.D.	

Název diplomové práce:

Srovnání některých nových odrůd rybízů z hlediska vybraných obsahových látek

Zadání diplomové práce:

Teoretická část:

- 1) Stručná charakteristika rybízu, účinných látek v něm obsažených a jeho využití v potravinářství
- 2) Anthokyany, jejich vlastnosti a využití v potravinářském průmyslu, metody stanovení
- 3) Vitamin C, jeho vlastnosti a význam, metody stanovení
- 4) Celková antioxidační kapacita, metody stanovení

Experimentální část:

- 1) Ověření vybraných metod stanovení jednotlivých nutričních parametrů na standardech
- 2) Analýzy vybraných nutričních parametrů ovoce ve vzorcích studovaných odrůd rybízu
- 3) Zpracování získaných dat a interpretace výsledků

Termín odevzdání diplomové práce: 3.5.2013

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Leona Marková
Student(ka)

RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2013

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá rybízem (*Ribes L.*) a látkami v něm obsaženými, zejména anthokyanovými barvivy, vitamínem C a antioxidanty. V teoretické části je uvedena základní charakteristika o rostlině, včetně odrůd rybízu. V následujících kapitolách je zpracován přehled o účinných látkách obsažených v plodech a také o možnostech zpracování a využití rybízu hlavně v potravinářském průmyslu. Velká pozornost je věnována anthokyanům, jejich charakteristice, využití v potravinářství, faktorům, které ovlivňují jejich stabilitu a především metodám stanovení. V závěru teoretické části je popsán význam a metody stanovení vitamínu C a antioxidační kapacity.

Vybrané nutriční parametry byly stanovovány v patnácti známých a ve třech neznámých odrůdách rybízů. Anthokyaniny byly měřeny spektrofotometricky a stanovovány pomocí HPLC u barevných vzorků. Metodou pH diferenciální byl zhodnocen obsah monomerních a polymerních pigmentů. Metodou HPLC byla identifikována jednotlivá anthokyanová barviva obsažená v plodech. Dále byl stanoven obsah kyseliny askorbové ve všech odrůdách metodou HPLC. U bílých rybízů byla porovnána jejich antioxidační kapacita, měřená metodou DPPH.

ABSTRACT

Diploma thesis deals with currant (*Ribes L.*) and substances which currants contain especially anthocyanin pigments, vitamin C and antioxidants. In theoretical part is described basic characteristic about plant, including varieties of currants. The following chapters include a list of active substances which the fruit contains and also the list of some possibilities of processing and utilization of currant especially in the food industry. Big attention is given to anthocyanins, their characteristics, utilization in the food industry, factors that affect their stability and especially methods of determination. In conclusion, the theoretical part describes importance and methods of determination of vitamin C and antioxidant capacity.

Selected nutritional parameters were determined in fifteen known and in three unknown varieties of currants. Anthocyanins were measured spectrophotometrically and determined by HPLC in color samples. By pH differential method was evaluated a content of monomeric and polymeric pigments. By HPLC method were identified individual anthocyanin pigments contained in fruits. Also, content of ascorbic acid was determined by HPLC in all varieties. Antioxidant capacity of white currants measured by DPPH was compared.

KLÍČOVÁ SLOVA:

rybíz, *Ribes L.*, anthokyaniny, vitamín C, antioxidační kapacita, pH diferenciální metoda, HPLC, DPPH

KEYWORDS:

currant, *Ribes L.*, anthocyanins, vitamin C, antioxidant capacity, pH differential method, HPLC, DPPH

MARKOVÁ, L. *Srovnání některých nových odrůd rybízů z hlediska vybraných obsahových látek*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 76 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

Poděkování

Ráda bych poděkovala své vedoucí paní RNDr. Mileně Vespalcové Ph.D. za vstřícnost a odborné vedení v průběhu zpracování diplomové práce.

Mé velké dík patří též Ing. Jitce Cetkovské za ochotu a poskytnuté praktické rady během práce v laboratoři.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1	Rod Ribes.....	8
2.1.1	Význam a uplatnění rybízu.....	8
2.1.2	Popis rybízu	8
2.1.3	Odrůdy	8
2.1.4	Obsah účinných látek v plodech rybízu.....	9
2.1.5	Využití plodů pro potravinářské účely	13
2.2	Anthokyaniny.....	15
2.2.1	Chemická struktura anthokyanů	15
2.2.2	Stabilita anthokyanů	17
2.2.3	Využití anthokyanů v potravinářském průmyslu.....	22
2.2.4	Metody stanovení anthokyanů.....	22
2.3	Vitamin C.....	28
2.3.1	Struktura	29
2.3.2	Význam v lidském organismu	30
2.3.3	Význam z výživového hlediska.....	30
2.3.4	Metody stanovení vitamínu C.....	31
2.4	Celková antioxidační kapacita	34
2.4.1	Antioxidanty	35
2.4.2	Metody stanovení antioxidační kapacity	36
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	39
3.1	Stanovení anthokyanů v plodech rybízu pH diferenciální metodou.....	39
3.1.1	Použité pomůcky, přístroje a chemikálie.....	39
3.1.2	Příprava roztoků	39
3.1.3	Příprava šťávy z plodů červeného a černého rybízu.....	40
3.1.4	Příprava vzorků.....	40
3.1.5	Měření absorpčního spektra anthokyanů při různém pH.....	40
3.1.6	Měření absorbance vzorků.....	40
3.1.7	Stanovení celkového zastoupení anthokyanových barviv v plodech rybízu ..	41
3.2	Stanovení anthokyanů v plodech rybízu metodou HPLC.....	42
3.2.1	Použité pomůcky, přístroje a chemikálie.....	42
3.2.2	Příprava roztoků	43
3.2.3	HPLC analýza.....	43

3.3	Stanovení vitamínu C v plodech rybízu metodou HPLC.....	44
3.3.1	Použité pomůcky, přístroje a chemikálie.....	44
3.3.2	Příprava roztoků	44
3.3.3	HPLC analýza.....	45
3.3.4	Stanovení celkového množství vitamínu C v plodech rybízu	46
3.4	Stanovení antioxidační kapacity v plodech rybízu metodou DPPH	46
3.4.1	Použité pomůcky, přístroje a chemikálie.....	46
3.4.2	Příprava roztoků	46
3.4.3	Měření absorbance vzorků.....	47
3.4.4	Stanovení celkové antioxidační kapacity v plodech rybízu.....	47
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	48
4.1	Stanovení anthokyanů pH diferenciální metodou.....	48
4.1.1	Absorpční spektra anthokyanů při pH 1 a pH 4,5	48
4.1.2	Výsledné hodnoty množství anthokyanů v plodech vybraných odrůd rybízu .	49
4.2	Stanovení anthokyanů metodou HPLC.....	51
4.2.1	Optimalizace gradientu mobilní fáze.....	52
4.2.2	Identifikace jednotlivých píků anthokyanových barviv	52
4.2.3	Vlastní stanovení obsahu anthokyanových barviv v plodech vybraných odrůd rybízu	55
4.3	Stanovení vitamínu C metodou HPLC.....	59
4.3.1	Sestrojení kalibrační závislosti	59
4.3.2	Stanovení vitamínu C	60
4.3.3	Výsledné hodnoty množství vitamínu C v plodech vybraných odrůd rybízu	61
4.4	Stanovení antioxidační kapacity metodou DPPH	63
4.4.1	Výsledné hodnoty zhášecí aktivity extraktů z odrůd bílých rybízů.....	64
5	ZÁVĚR.....	65
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	67
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	71
8	SEZNAM PŘÍLOH	73
9	PŘÍLOHY	74

1 ÚVOD

Rybíz je jedním ze zástupců drobného ovoce a řadí se k hodnotným zdrojům nutričně významných látek, zejména vitamínu C. Již v dávné minulosti byla člověkem většina druhů drobného ovoce, pro bohatý obsah chuťových a aromatických látek, cílevědomě vyhledávána a později také pěstována. Příznivý poměr obsahu organických kyselin, cukrů, pektinu, barevných a aromatických vlastností způsobil, že je rybíz velmi významnou surovinou pro zpracovatelský průmysl. V dnešní době se plody rybízu zpracovávají hlavně v potravinářském průmyslu, jako vysoce kvalitní surovina, vhodná pro výrobu širokého sortimentu výrobků. Na rozšíření pěstování rybízu má výrazný vliv konzervářská a mrazírensko-technologická vhodnost tohoto ovocného druhu pro zpracování. Plody rybízu příznivě působí na zdraví organismu, proto se používají i ve farmaceutickém průmyslu, k výrobě různých kapek, sirupů a doplňků stravy. V kosmetice se využívá zejména černý rybíz a to pro svoji barvu a aroma.

V moderní společnosti stoupá počet civilizačních onemocnění, která souvisí s působením volných radikálů, a proto vzrůstá snaha chránit organismus před těmito radikály. K eliminaci jejich vlivu může přispívat vyšší příjem exogenních antioxidantů, které jsou přítomny v mnoha rostlinných materiálech i v plodech rybízu. Díky tomu vzrůstá tendence hodnotit antioxidační vlastnosti čistých přírodních látek, rostlinných extraktů i potravinových doplňků. K hlavním antioxidantům obsaženým v plodech rybízu patří vitamin C, jehož bohatým zdrojem je černý rybíz. Mezi antioxidační vitaminy se řadí i vitamin A a E, které jsou v plodech zastoupeny už méně, a proto jim nebyla věnována pozornost. Anthokyany se řadí také mezi významné látky eliminující volné radikály. Tato diplomová práce se zabývá stanovením obsahu nutričně významných antioxidantů v plodech rybízů různých odrůd, pěstovaných v lokalitách Lysice (podnik Zeas a.s. Lysice), Padochov a Želešice.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Rod *Ribes*

2.1.1 Význam a uplatnění rybízu

Rybíz je nutričně vysoce hodnotné ovoce ke spotřebě v čerstvém stavu, ale hlavně je důležitou konzervářenskou surovinou. Úroda je jistá i v povětrnostně nepříznivém vegetačním období. Rybízy patří mezi důležité zdroje vitaminů a esenciálních minerálií. Plody nemají vysokou kalorickou hodnotu, protože obsah glycidů, tuků a dusíkatých látek je poměrně nízký.

Na minerální látky jsou nejbohatší černé rybízy. Mají poměrně vysoký obsah organických kyselin (1–4 %), které mají antibakteriální účinky. V zahrádkách se červené a černé rybízy pěstují v poměru 1 : 1.

Bílé rybízy se pěstují v menším zastoupení [1].

2.1.2 Popis rybízu

Rybíz patří botanicky do čeledi meruzalkovitých (*Grossulariaceae*), do rodu *Ribes*. Do rodu *Ribes* patří kolem 120 až 130 botanických druhů rybízů rostoucích v přírodě planě v mírně tropickém a subtropickém pásmu.

Rybíz vytváří víceleté keře rozložitého až vzpřímeného vzrůstu. U našich druhů rybízů jsou listy opadavé a letorosty jsou holé, beztrnné. Kvete především buď přímo na jednotlivých výhonech, anebo na plodonosném obrostu na dvouletých a méně již na starších větvích. Doba intenzivního narůstání letorostů bývá koncem května až začátkem června. Květy jsou nevýrazné, světle žlutozelené až slabě načervenalé a u černoplodých rybízů i nafialověle zbarvené. Jednotlivé kvítky jsou talířovitého nebo miskovitého až zvonkovitého tvaru a jsou podle botanického druhu i odrůdy shloučeny v různě husté a dlouhé hrozny. Kvetou velmi časně, přibližně od druhé poloviny dubna. Délka květu bývá podle teplotních podmínek 8 až 20 dní.

Bobule dozrávají podle ranosti odrůd (velmi raná, středně raná, raná, středně pozdní, pozdní, velmi pozdní) asi od 20. června až do poloviny srpna. Jsou různě velké, holé nebo jemně oplstěné a červeně, černě, růžově nebo bíle zbarvené.

Kořenová soustava je středně silná, roste spíše mělce a do šířky. Převážná část kořenů se rozkládá v hloubce asi 20 cm a zasahuje až za okapovou část koruny keře nebo stromku. Nadzemní části rybízu u většiny odrůd velmi snadno zakořeňují [1].

2.1.3 Odrůdy

Na dosažení bohaté úrody rybízu na zahrádkách i ve větších výsadbách má, kromě vhodného stanoviště, dodržování optimálních agrotechnických opatření a dobrého zdravotního stavu keře nebo stromku, rozhodující vliv odrůda.

Ve státní odrůdové knize ČR jsou zaregistrovány následující odrůdy.

- Bílé rybízy

Blanka, Primus, Viktoria, Jantar, Olin, Orion. Perspektivní je švédská odrůda Vit Jätte a slovenské odrůdy Dominika a Gerlach.

- Červené rybíz

Detvan, Heinemannův pozdní, Holandský červený, Hron, Jonkheer van Tet's, Koral, Losan, Maraton, RedLake, Rondon, Rubigo, Tatran, Vitan a Trent. Perspektivní jsou i zahraniční odrůdy, např. Rekord, Expres a další.

- Černé rybíz

Damon, Eva, Fertödi I, Favorit, Moravia, Otelo, Öjebyn, Roodknop, Viola. Perspektivní jsou i zahraniční odrůdy Katka, Zuzka, Titánie, Triton, Tiben, Tisel, Ben Lemond a další [1].

2.1.4 Obsah účinných látek v plodech rybíz

2.1.4.1 Složení plodů

Pro rybíz je charakteristický především vysoký obsah vody. Množství cukrů, fruktosy a glukosy, je kromě samotného druhu pochopitelně závislé i na odrůdě a na teplotním charakteru ročníku. Rybíz má minimální obsah sacharosy.

Množství vlákniny se liší, jak podle druhu, tak i stáří plodů, množství a velikosti semen a vegetačních podmínek.

Dostatečné množství pektinových látek umožňuje snadné želírování konzervářských výrobků, tedy vytváření rosolů. U zralých plodů se však protopektin mění na pektin, čímž se schopnost vytvářet rosol značně snižuje.

Obsah tuků a bílkovin v rybíz z hlediska jejich množství a složení nemá pro výživu člověka praktický význam.

Velmi důležitým faktorem je obsah vitamínu C, který je přítomen ve formě kyseliny L-askorbové. Její obsah vzrůstá až do doby ukončení růstu plodů. Při zrání se snižuje, a to až o jedno procento denně. Samotný obsah vitamínu C je ovlivňován charakterem klimatických podmínek v průběhu roku a velmi výrazně i samotnými odrůdami.

Srovnáváme-li obsah vitamínu C v černém rybíz s obsahem vitamínu C v citrónech, pak při výnosu asi 6 kg rybíz z jednoho keře se tato sklizeň obsahem vitamínu C rovná přibližně 14 kg citrónů [1].

Tabulka 1: Obsah vitamínu C v plodech různých odrůd rybízů [2, 3, 4]

Rybíz	Odrůda	Askorbová kyselina (mg · 100 g ⁻¹)
červený	Rovada	40
červený	London Market	35,6
bílý	White Versailles	38,1
černý	Ben Lomond	164,5; 180

Rybíz obsahují také flavonoidy, tedy vitamin P a v poměrně malém množství jsou zastoupeny provitaminy skupiny A - karoteny. Obsah vitamínů skupiny B není příliš významný.

Z organických kyselin jsou zastoupeny především tzv. ovocné kyseliny - citrónová, jablečná a vinná, kdežto ostatní, jako např. mravenčí, šťavelová a jantarová, jen v zanedbatelných množstvích. Při látkových přeměnách se tyto kyseliny mění hlavně na kyselé uhličitany, přičemž organismus získává určitou energii.

Přítomnost tříslovin se v ovoci projevuje všeobecně ztmavnutím vylisovaných šťáv. Složení aromatických látek není dosud zcela přesně prozkoumáno [1].

Tabulka 2: Chemické složení rybízu, obsah nutrietu ve 100 g jedlého podílu [1]

Název nutrientu	Rybíz černý	Rybíz červený	Rybíz bílý	Jednotka
Bílkoviny celkové	1,49	1,97	-	g
Dusík celkový	0,2	0,2	-	g
Lipidy celkové	0,92	1,73	-	g
Sacharidy celkové	9,8	4,5	7,0	g
Glukosa	3,3	1,5	2,8	g
Fruktosa	3,9	3,0	2,8	g
Sacharosa	1,3	-	0,8	g
Vláknina potravy	5,8	4,2	6,3	g
Voda celková	82,0	85,4	-	g
Popel	0,8	0,8	-	mg
Pektin	1,60	1,47	1,08	mg
Třísloviny	0,42	0,119	-	mg
Polynenasycené mastné kyseliny				
Omega-6 mastné kyseliny	0,07	0,04	-	g
C 18:2, ω-6	0,07	0,04	-	g
Vitaminy				
Vitamin B1 (thiamin)	0,06	0,04	-	mg
Vitamin B2 (riboflavin)	0,04	0,02	-	mg
Vitamin C	181	40,2	50	mg
Vitamin A	0,15	0,9	-	mg
Beta-karoten	81	24	-	μg
Vitamin E	2,1	0,80	-	ATE
Alfa - tokoferol	2,1	0,80	-	mg
Vitamin P	2 138	450	400	mg
Minerální látky				
Sodík	4	3	-	mg
Hořčík	19	16	-	mg
Fosfor	54	32	-	mg
Draslík	321	242	-	mg
Vápník	42	32	-	mg
Síra	4,1	7,2	-	mg
Železo	1,3	1,0	-	mg

- Sacharidy

Sacharidy jsou nejrozšířenější přírodní látky, obsažené ve všech rostlinných a živočišných buňkách. Sacharidy jsou zastoupeny polyhydroxyaldehydy nazývanými též aldosa a polyhydroxyketony neboli ketosami, jejichž molekuly jsou složeny minimálně ze tří alifaticky vázaných atomů uhlíku. Podle počtu atomů uhlíku přítomných v molekule se sacharidy dělí na triosy, tetrosy, pentosy, hexosy atd. Rozlišují se také podle počtu cukerných jednotek vázaných v molekule na monosacharidy, tvořené jednou cukernou jednotkou, oligosacharidy, tvořené dvěma až deseti cukernými jednotkami a polysacharidy neboli glykany, které jsou tvořeny více než deseti cukernými jednotkami.

Biosyntéza a degradace sacharidů poskytují důležité komponenty primárního metabolismu, které jsou nezbytné pro všechny živé organismy. Sacharidy vznikají v přírodě v buňkách fotoautotrofních organismů fotosyntézou a rostliny je využívají jako vlastní zdroj energie, syntetizují z nich konstrukční součásti buněčné stěny a různé složky mnoha biologicky aktivních látek jako glykoproteiny, proteoglykany, glykolipidy, některé hormony, koenzymy, vitaminy aj. Heterotrofní organismy získávají potřebné sacharidy z organismů autotrofních nebo z nesacharidových substrátů, jako jsou některé aminokyseliny, hydroxykyseliny, glycerol a jiné látky. Tento děj se nazývá glukoneogeneze.

Plody rybízu obsahují monosacharidy (glukosu, fruktosu), oligosacharidy (sacharosu) a polysacharidy (hemicelulosu, pektiny) [1].

- Vlákna

Vlákna neboli vláknina potravy je termín, který zahrnuje látky řadící se k nevyužitelným polysacharidům. Konkrétně jsou to celuloza, hemicelulosa a pektin, dále polysacharidy používané jako aditivní látky (polysacharidy mořských řas, mikrobiální polysacharidy, rostlinné gumy a slizy, modifikované polysacharidy) a lignin, z živočišných polysacharidů je to chitin (a modifikovaný chitin chitosan). Některé z nich, např. pektin, mohou být relativně dobře využitelné.

Podle rozpustnosti ve vodě se vláknina dělí na rozpustnou a nerozpustnou. K vláknině rozpustné ve vodě se řadí určitý podíl hemicelulosy, pektiny, rostlinné slizy, polysacharidy mořských řas, modifikované škroby a modifikované celulosy. Hlavní podíl nerozpustné vlákniny tvoří celuloza, určitý podíl hemicelulosy a dále lignin. Poměr nerozpustné a rozpustné vlákniny v potravě by měl být 3 : 1 [1].

- Pektin

Pektin je komplexní kyselý polysacharid složený z lineárního řetězce 25–100 jednotek D-galakturonové kyseliny s vazbami α -(1→4). Pektiny se nacházejí v pletivech všech vyšších rostlin, kromě jednoděložných, jako součást stěn primárních buněk a mezibuněčných prostor. Pektinové polysacharidy mají tedy rozhodující vliv na strukturu buněčné stěny, růst rostlin, a jejich vývoj. Pektiny se nacházejí ve všech druzích ovoce a zeleniny [1].

- Vitamin C

Kyselina askorbová je základní biologicky aktivní sloučenina vitamínu C. Existují čtyři možné stereoisomery kyseliny askorbové a pouze L-askorbová kyselina vykazuje aktivitu vitamínu C. Její isomer D-askorbová kyselina a druhý pár enantiomerů, L a D-isoaskorbová kyselina aktivitu vitamínu C nevykazují.

Vitamin C je nezbytný k životu a v lidském těle plní mnoho důležitých funkcí. Je rozpustný ve vodě, dále citlivý na teplo a vysoce oxylabilní. V přírodě se nachází ve dvou formách, kyselina askorbová jako redukovaná forma a kyselina dehydroaskorbová jako oxidovaná forma. Kyselina askorbová má silné redukční vlastnosti, lehce se oxiduje na kyselinu dehydroaskorbovou a vytváří tím tak v přírodě důležitý oxidačně-redukční systém. V potravinách rostlinného původu je zpravidla 90–95 % vitamínu C přítomno ve formě askorbové kyseliny, zbytek tvoří dehydroaskorbová kyselina [1].

- Vitamin A

Vitamin A i jeho provitaminy jsou chemicky terpenoidy nazývané také isoprenoidy. Provitaminy A jsou tetraterpeny nebo tetraterpenoidy (kyslíkaté deriváty), které obsahují v molekule 40 atomů uhlíku. Štěpné produkty provitaminů A jsou apokarotenoidy a u rostlin plní funkci hormonů, pigmentů, vonných látek a řadu obranných funkcí. Základním biologicky aktivním apokarotenoidem v živočišných tkáních je retinol neboli vitamin A₁.

Aktivitu vitamínu A vykazuje dalších asi padesát přirozeně se vyskytujících sloučenin ze skupiny karotenoidů (tetraterpenů), které se nazývají provitaminy A. Nejvýznamnějším provitaminem A je beta-karoten. Beta-karoten se vyskytuje jako barvivo v žlutooranžovém a tmavě zeleném ovoci a zelenině. Kromě toho, že slouží jako zdroj vitamínu A, vykonává v organismu řadu dalších funkcí. Především působí jako antioxidant [1].

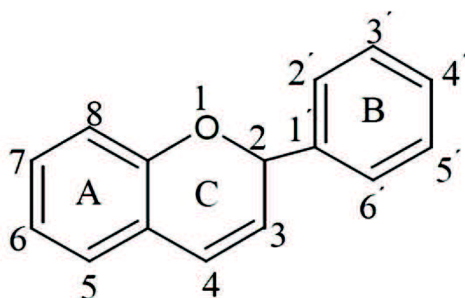
- Třísloviny

Třísloviny neboli tanniny jsou fenolové sloučeniny interagující s proteiny. Rostlinné tanniny se dělí do dvou tříd, na hydrolyzovatelné třísloviny a kondenzované třísloviny. Hydrolyzovatelné třísloviny jsou polymery esterů gallové kyseliny nazývané polygalloylestery. Kondenzované tanniny jsou polymery některých flavonoidních látek mající strukturu 3-hydroxyflavanu nazývané flavolany. Existují i komplexní tanniny, což jsou sloučeniny vzniklé libovolnou kombinací hydrolyzovatelných a kondenzovaných tříslovin.

Interakcí proteinů slin s některými polymerními fenolovými sloučeninami přítomnými v potravinách rostlinného původu vzniká trpká chuť. Třísloviny obsažené v potravinách tedy značným způsobem ovlivňují žádoucí i nežádoucí chuťové vlastnosti potravin. Žádoucí je přiměřená trpkost např. u kávy. Nežádoucí trpkost má nezralé ovoce např. banány [1].

- Flavonoidy

Skupinu rostlinných barviv představují flavonoidní látky. Vyskytují se jako volné látky, častěji jako glykosidy, acylované glykosidy, i jako polymery. Množství flavonoidů se odhaduje na 4 000 až 5 000 sloučenin. Každou molekulu tvoří dva benzenové kruhy spojené tříuhlíkovým řetězcem. Ve většině sloučenin je C₃ řetězec součástí heterocyklického kruhu odvozeného od 2*H*-pyranu. Flavonoidy jsou tedy odvozeny od kyslíkaté heterocyklické sloučeniny flavanu, který je tvořen 2*H*-chromenem se substitucí v poloze C-2 fenylovou skupinou. Většinou bývají všechny tři kruhy substituovány hydroxyskupinami nebo methoxyskupinami a jednotlivé deriváty se liší pouze stupněm substituce a oxidace a právě na základě substitucí a stupně oxidace na C₃ řetězci se rozlišují základní struktury flavonoidů: katechiny, leukoanthokyanidiny, flavanony, flavononoly, flavony, flavonoly, anthokyanidiny [1].



Obrázek 1: Struktura flavanu [1]

2.1.5 Využití plodů pro potravinářské účely

Drobné ovoce se nejvíce konzumuje čerstvé nebo po krátkém uskladnění. Je však prvotřídní surovinou, z níž se dají vyrobit nejrůznější produkty. Během konzervování se mohou některé původní obsahové složky změnit a vytvořit nový, ale nutričně i sensoricky žádoucí látkový komplex (termosterilizace, kvašení), anebo do značné míry zachovávat původní vlastnosti suroviny (opatrné sušení, zmrazování).

Aby se z drobného ovoce vyrobily kvalitní výrobky, je třeba používat zdravou, vyvinutou a kvalitní surovinu bez chorob a živočišných škůdců, ve správné technologické zralosti s přihlédnutím na charakter výrobku. Například jinou surovinu použijeme na výrobu kompotů a jinou k výrobě sirupů.

Roční spotřeba drobného ovoce na jednoho obyvatele (4,5 kg) u nás výrazně zaostává za vyspělými zeměmi a právě zvýšená konzumace konzervovaných výrobků může tuto hranici posunout výše. Průmyslově i v domácnosti lze vyrobit velmi kvalitní výrobky při respektování požadavků zdravé výživy a je možno tak pomoci omezit vysokou spotřebu sladkostí vyrobených na cukrové a cukrovo-tukové bázi.

Červené, černé a bílé rybízky se převážně využívají k výrobě tekutých a kašovitých výrobků (šťávy, vína, likéry, sirupy, protlaky, marmelády, rosoly apod.). Vhodné jsou velké bobule, zralé, zdravé a s nízkým podílem stopek. Na výrobu pomazánek a rosolů nemusí být plody úplně zralé. Rybíz můžeme také sušit a poté jej konzumovat jako čaj [1].

Další využití plodů rybízu

Červený rybíz se nejvíce používá na výrobu marmelád a rosolů. Plody bílého a červeného rybízu mají trpkou chuť, a proto se při výrobě jejich kompotů většinou míchají s jiným, méně kyselým, ovocem. Džus z bílého a červeného rybízu má příznivé účinky na tlumení horečky. Hlavně v Evropě je bílý rybíz používán i v dětské výživě, neboť má méně výraznou chuť než červený a černý rybíz. Ve Finsku je bílý rybíz zpracováván na vína i vína šumivá.

Listy a pupeny černého rybízu jsou bohaté na fenolové sloučeniny a již dlouho se používají jako bylinné léky. V Rusku se rybízové listy používají při výrobě bylinného čaje, který má podobnou chuť jako zelený čaj. V Evropě je velmi populární šťáva z černého rybízu, která se používá převážně k výrobě vín a likérů. Obvykle se šťáva z černého rybízu míchá s jinými ovocnými šťávami, aby se snížila její příliš výrazná chuť.

Vhodným způsobem konzervace rybízu je i mražení s následným mnohostranným použitím. Plody zejména černého rybízu se uplatňují jako příchuť zmrzlin, müsli, různých mléčných výrobků, např. jogurtů a jogurtových nápojů a také mohou být součástí přídatných látek do bonbonů a jiných sladkostí.

Černý rybíz je používán i ve farmaceutickém průmyslu ve formě produktů různých kapek, sirupů, tablet a to nejenom díky vysokému obsahu vitamínu C. Plody rybízu mají močopudný a potopudný účinek, aktivují látkovou výměnu, odbourávají z těla nežádoucí látky, zlepšují pružnost cév, jsou účinným lékem proti křečovým žilám a hemeroidům. Napomáhají při alergických kožních reakcích, střevních problémech a revmatismu. Příznivě působí při zánětech hrtanu a hltanu, mírní bolest v krku a posilují imunitní systém.

Extrakt z pupenů černého rybízu lze využívat také v kosmetice, v podobě parfémů a tělové kosmetiky [1].



Obrázek 2: Výrobky z plodů rybízu

sypaný čaj ⁽¹⁾, likér ⁽²⁾, nektar ⁽³⁾, rosol ⁽⁴⁾, alkoholický nápoj ⁽⁵⁾, müsly ⁽⁶⁾, marmeláda ⁽⁷⁾, sirup ⁽⁸⁾, zmrzlina ⁽⁹⁾, šampon ⁽¹⁰⁾, džus ⁽¹¹⁾, bonbony ⁽¹²⁾

2.2 Anthokyany

Anthokyany (z řeckého anthos - květina a kianos - modrá) jsou přírodní barviva vyznačující se širokou škálou barev a prospěšnými zdravotními účinky.

Navzdory velkému aplikačnímu potenciálu, které anthokyany představují pro potravinářský, farmaceutický a kosmetický průmysl, bylo používání těchto látek omezeno, z důvodu jejich relativní nestability a nízké výtěžnosti (nízkému extrakčnímu procentu). V současné době se většina výzkumů anthokyanů zaměřuje na řešení těchto problémů, stejně jako na jejich purifikaci a identifikaci.

Díky rostoucímu zájmu o nahrazení syntetických barviv s toxickými účinky na člověka se studium a zkoumání přírodních barviv stává rozsáhlou a aktivní oblastí.

Karotenoidy a anthokyany patří mezi nejvíce využívaná zeleninová barviva v potravinářském průmyslu. Karotenoidy jsou rozpustné v tucích, stabilní a schopné barvit potravinářské výrobky od žluté do červené barvy. Na druhou stranu, anthokyany jsou rozpustné ve vodě a méně stabilní oproti karotenoidům. Jsou extrahovány z hroznů, bobulí, červeného zelí, jablek, ředkviček, tulipánů, růží a orchidejí. Karotenoidy jsou získávány především z rajčat, mrkve a papriky.

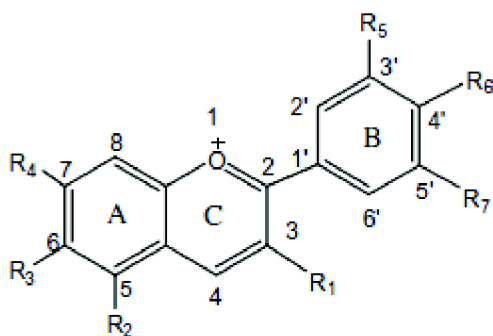
Anthokyany jsou nejdůležitějšími pigmenty vyšších rostlin. Jsou široce rozšířené v přírodě a snadně inkorporují ve vodném prostředí, což je činí zajímavými pro jejich použití jako přírodní ve vodě rozpustná barviva. Tyto pigmenty jsou zodpovědné za oranžové, růžové, červené, fialové, modré barvy květin a plodů některých rostlin.

Další významnou vlastností anthokyanů je jejich antioxidační aktivita, která hraje důležitou roli v prevenci kardiovaskulárních, nervových, rakovinných onemocnění a cukrovky [5].

2.2.1 Chemická struktura anthokyanů

Anthokyanidiny jsou základní strukturou anthokyanů. Anthokyanidiny (tzv. aglykony) jsou odvozeny od struktury flavyliového kationtu, který se skládá z aromatického kruhu (A) vázaného na heterocyklický kruh (C), který obsahuje kyslík. Kyslík je spojen vazbou uhlík-uhlík na třetí aromatický kruh (B) (Obrázek 3).

Pokud se anthokyanidiny nacházejí v glykosidové formě (vázané na cukernou složku), jsou označovány jako anthokyany [5, 6].



Obrázek 3: Struktura flavyliového kationtu [5]

Barva kterou vykazují tyto molekuly byla poprvé vysvětlena Paulingem v roce 1939, který navrhl, že rezonanční struktura flavyliového iontu způsobuje intenzitu jejich barvy.

Barva aglykonů je do značné míry barvou materiálů, ve kterých jsou obsaženy. Ve všech rostlinných materiálech jsou hlavními pigmenty glykosidy a acylované glykosidy anthokyanidinů. V některém ovoci nebo zelenině jsou přítomny anthokyaniny odvozené pouze od jediného anthokyanidinu, jindy jsou barviva odvozena od několika různých anthokyanidinů např. anthokyaniny černého rybízu jsou deriváty kyanidinu a delfinidinu.

Pět sacharidů představuje cukernou složku molekuly anthokyanů. Nejvíce se v anthokyanech vyskytuje D-glukosa, L-rhamnosa, D-galaktosa a v menší míře D-xyloza i L-arabiosa.

Sacharidy jsou vázány vždy v poloze C₃, pokud je glykosylována další hydroxyskupina, děje se tak v poloze C₅, v tomto případě je cukrem glukosa, méně často rhamnosa, výjimečně se cukr váže do polohy C₇, C_{3'}, C_{5'} a C_{4'} (obvykle glukosa). Pokud je na C₃ hydroxyskupina volná, dochází k destabilizaci anthokyanidinového chromoforu, takže hydrolyza cukru vázaného jako O-glykosid na C₃ způsobí rychlý rozklad anthokyanidinu a jeho nevratnou ztrátu barvy.

Podle počtu navázaných molekul cukru se anthokyaniny dělí na 18 skupin, z nichž nejvýznamnější jsou:

Monosidy – molekula aglykonu je vázána s jednou molekulou monosacharidu (např. s glukosou, galaktosou, rhamnosou nebo arabiosou) v poloze C₃

Biosidy – molekula aglykonu je vázána v poloze C₃ s jednou molekulou disacharidu (např. s rutinosou, sambubiosou, soforosou, genciobiosou, neohesperidosou, laminaribiosou, robinobiosou aj.)

Triosidy – molekula aglykonu je vázána s lineárními nebo rozvětvenými trisacharidy vázanými v poloze C₃

3,5-diglykosidy – molekula aglykonu s monosacharidy v poloze C₃ a C₅

3,7-diglykosidy – molekula aglykonu s monosacharidy v poloze C₃ a C₇

3-biosidy-5-monosidy – molekula aglykonu je v poloze C₃ vázána s disacharidem a v poloze C₅ s monosacharidem

Cukry bývají často acylovány fenolovými kyselinami (p-kumarovou, kávovou, ferulovou, sinapovou, méně často p-hydroxybenzoovou), malonovou a octovou. Kyselina se obvykle váže na hydroxylovou skupinu glukosy v poloze C₆ a u rhamnosy v poloze C₄. S výjimkou jsou acylovány pouze 3-glykosidy [7, 8].

Existuje obrovské množství anthokyanů rozšířených v přírodě (nejčastější názvy a zkratky jsou uvedeny v Tabulce 3). Hlavní rozdíly mezi anthokyaniny jsou počet hydroxylových skupin, povaha a množství navázaných cukrů na jejich strukturu. Dále alifatické nebo aromatické karboxyláty vázané na cukr v molekule a pozice těchto vazeb.

Zatím je známo 500 různých anthokyanů a 23 anthokyanidinů, z nichž pouze šest je nejběžněji zastoupených v cévnatých rostlinách (Pg, Pn, Cy, Mv, Pt, Dp).

V přírodě jsou nejčastější glykosidové deriváty tří nemetylovaných anthokyanidinů (Cy, Dp a Pg), vyskytují se 80% v pigmentových listech, 69% v ovoci a 50% v květinách.

Rozdělení šesti běžných anthokyanidinů v ovoci a zelenině je: Cy 50%, Dp 12%, Pg 12%, Pn 12%, Pt 7% a Mv 7%. Glykosidové deriváty nejvíce rozšířené v přírodě jsou 3-monosidy, 3-biosidy, 3,5 a 3,7-diglucosidy. Výskyt 3-glukosidových derivátů je dvaapůlkrát častější než 3,5-diglucosidů a nejčastějším anthokyanem je kyanidin 3-glukosid.

Obrovská rozmanitost, anthokyanů nalezených v přírodě, z nich dělá velmi složitou a zajímavou skupinu [5].

Tabulka 3: Strukturální identifikace anthokyanů [5]

Jméno	Zkratka	Substituční skupina							Barva
		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	
Apigeninidin	Ap	H	OH	H	OH	H	OH	H	-
Arrabidin	Ab	H	H	OH	OH	H	OH	OMe	není zjištěna
Aurantininidin	Au	OH	OH	OH	OH	H	OH	H	-
Capensinidin	Cp	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OMe	modro-červená
Carajurin	Cj	H	H	OH	OH	H	OMe	OMe	není zjištěna
Cyanidin	Cy	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	oranžovo-červená
Delphinidin	Dp	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	modro-červená
Europinidin	Eu	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OH	modro-červená
Hirsutidin	Hs	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	OMe	modro-červená
3'-HydroxyAb	3'OHAb	H	H	OH	OH	OH	OH	OMe	není zjištěna
6-HydroxyCy	60HCy	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH	červená
6-HydroxyDp	60HDp	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH	modro-červená
6-HydroxyPg	60HPg	OH	OH	OH	OH	H	OH	H	není zjištěna
Luteolin	Lt	H	OH	H	OH	OH	OH	H	-
Malvidin	Mv	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OMe	modro-červená
5-MethylCy	5-MCy	OH	OMe	H	OH	OH	OH	H	oranžovo-červená
Pelargonidin	Pg	OH	OH	H	OH	H	OH	H	-
Peonidin	Pn	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H	oranžovo-červená
Petunidin	Pt	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH	modro-červená
Pulchellidin	PI	OH	OMe	H	OH	OH	OH	OH	modro-červená
Riccionidin A	RiA	OH	H	OH	OH	H	OH	H	není zjištěna
Rosinidin	Rs	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	H	červená
Tricetinidin	Tr	H	OH	H	OH	OH	OH	OH	červená

2.2.2 Stabilita anthokyanů

Izolované anthokyaniny jsou velmi nestabilní a náchylné k degradaci. Jejich stabilita je ovlivněna několika faktory jako je pH, teplota skladování, chemická struktura, koncentrace, světlo, kyslík, rozpouštědla, přítomnost enzymů, flavonoidů, proteinů a kovových iontů. Hlavním cílem studií anthokyanů je hlavně jejich chemická stabilizace vzhledem k jejich velkému aplikačnímu potenciálu, blahodárným účinkům a jejich použití jako alternativa k umělým barvivům [5].

2.2.2.1 Rozpouštědla a koncentrační účinky anthokyanů

Nedávné výzkumy se syntetickými flavyliovými solemi v roztocích různé povahy (acetonitril:voda, ethanol, propylen-glykol, dioxan a 2-butanon) ukázaly, že změny barvy závisí na použitém rozpouštědle a koncentraci flavyliových solí. V protických rozpouštědlech flavyliové soli vykazují červené zbarvení, zatímco v aprotických rozpouštědlech jsou roztoky žluté. Tento fakt byl vysvětlen tím, že červené flavyliové soli odpovídají monomeru a žluté dimeru, proto při zvýšení koncentrace flavyliových solí, je favorizováno červené zbarvení.

Také bylo zjištěno, že pokud se zvýší obsah vody ve směsi acetonitril:voda, je monomer přeměněn na zelenou barvu dimeru. To znamená, že voda hraje důležitou úlohu v dimerizaci flavyliových solí.

2.2.2.2 *Vliv pH*

Anthokyaniny lze nalézt v různých chemických formách, které jsou závislé na pH prostředí (Obrázek 4).

Při pH 1 a nižším převládá struktura červeně zbarvených flavilyových solí, která přispívá k fialové a červené barvě (Obrázek 4, A). Při zvyšování pH na hodnotu 2 až 4 převažují chinoidní modré báze (Obrázek 4, B-D). Pro vznik neutrální chinoidní báze je nezbytná přítomnost volné hydroxyskupiny na jednom z uhlíků (C-5, C-7, C-4'). Při zvyšování pH se rovnováha posunuje ve prospěch bezbarvé karbinolové pseudobáze a purpurově červená barva slábne. Přibližně v rozmezí hodnot pH 4,0–4,5 dojde k úplnému odbarvení.

V rozmezích pH mezi 5 a 6 vznikají dvě téměř bezbarvé struktury, kterými jsou karbinolová pseudobáze (Obrázek 4, E) a žlutě zbarvený chalkon (Obrázek 4, F).

V rozmezí hodnot pH 7,5–8,0 se tvoří modře zbarvený aniont chinoidní báze. Po delší době nebo při dalším růstu hodnoty pH se intenzita modrého zbarvení snižuje a postupně se tvoří žlutý chalkon. Jestliže se roztok barviva znovu okyselí na hodnotu pH kolem 1, přemění se chinoidní a karbinolová báze znovu na flavyliový kationt. Transformace chalkonu je pomalejší a není kvantitativní.

V prostředí o pH vyšším než 7 jsou anthokyaniny degradovány v závislosti na jejich substitučních skupinách (Obrázek 4, degradační reakce).

Při pH mezi 4 a 6 existuje rovnováha mezi čtyřmi různými strukturami aglykonů: flavyliovým kationem, bezvodou quinoidní bází, bezbarvou karbinolovou pseudobází a světle žlutým chalkonem. Rovnováhu mezi chinoidní bází a karbinolem zajišťuje flavyliový kationt (Obrázek 4, D a E struktury).

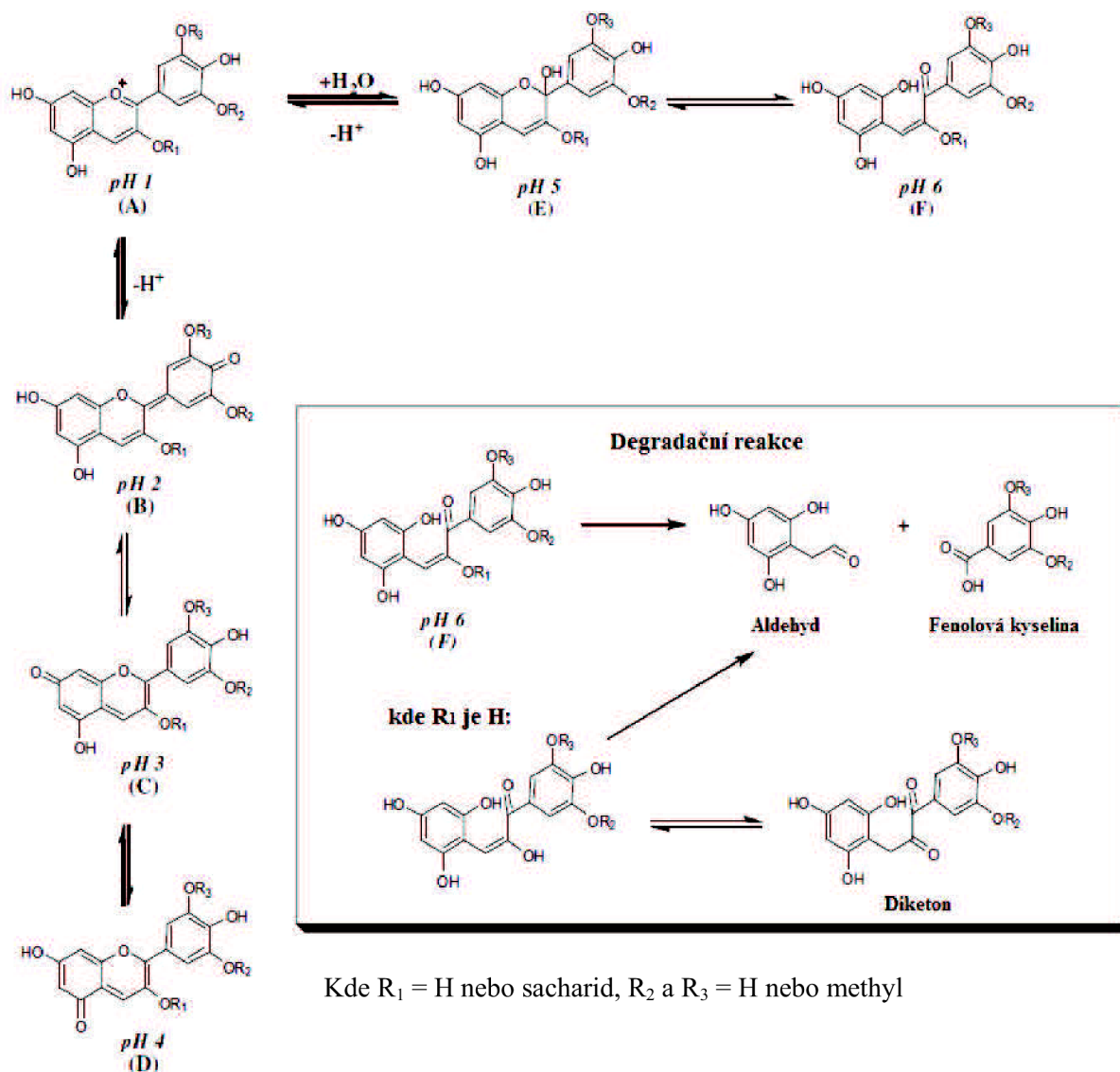
Stabilita anthokyanidinů je ovlivněna substituenty kruhu B a přítomností dalších hydroxylových nebo methoxylových skupin, které snižují stabilitu aglyconu v neutrálním prostředí, proto např. pelargonidin patří k nejstabilnějším anthokyanidinům.

Narozdíl od aglykonů, monoglykosidy a hlavně diglykosidové deriváty jsou stabilnější v neutrálním pH. Tato vlastnost je vysvětlena tím, že molekuly cukru zabraňují degradaci nestabilních meziproductů na fenolové kyseliny a aldehydové sloučeniny (Obrázek 4, degradační reakce).

Výzkum anthokyanové stability a změny barvy se změnou pH dospěl k závěru, že změny barev u těchto sloučenin jsou znatelnější v alkalickém prostředí, díky jejich nestabilitě.

Ve zpracovávaném ovoci a zelenině je však situace složitější. Anthokyaniny se v rostlinách (v prostředí o pH 2,5–7,5) vyskytují jako neutrální chinoidní báze. V potravinářských výrobcích se mohou nacházet v prostředí o jiném pH než je přirozené. Jsou však vesměs stabilizovány interkopigmentací (interakcí s jinými flavonoidy), nebo intrakopigmentací (acylované formy), případně interakcemi s jinými složkami potravin.

Řada výrobků si proto zachovává svoji původní, nebo částečně změněnou barvu. V dlouhodobě skladovaných výrobcích (např. jahodových džemech) vznikají oligomery s barvou podobnou barvě původních anthokyanů, přičemž původní anthokyaniny nemusí být vůbec přítomny [5, 8].



Obrázek 4: Chemická forma anthokyanů v závislosti na pH a degradační reakce anthokyanů [5] červená flavyliová sůl^(A), modrá chinoidní báze^(B-D), bezbarvá karbinolová pseudobáze^(E), žlutý chalkon^(F)

2.2.2.3 Kopigmentační efekt

Kopigmentace je jev, při kterém pigmenty tvoří komplexy s dalšími bezbarvými organickými sloučeninami, nebo kovovými ionty. Anthokyaniny tvoří komplexy s různými sloučeninami (kopigmenty) jako např. s flavonoidy, alkaloidy, aminokyselinami, organickými kyselinami, nukleotidy, polysacharidy, kovy nebo jinými anthokyaniny. Významné jsou zejména jejich interakce s jinými flavonoidy, bílkovinami a polysacharidy.

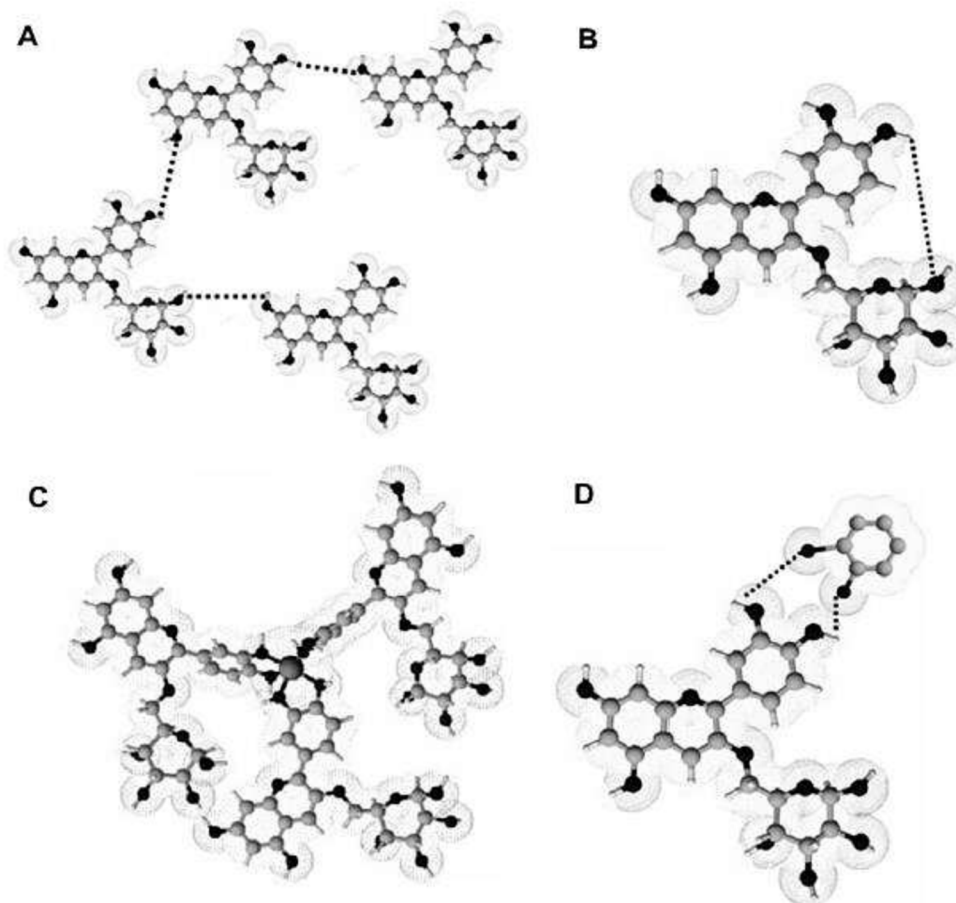
Většina partnerů anthokyanů v těchto reakcích jsou bezbarvé látky, ale vznik komplexu či jiného produktu s anthokyaniny zvyšuje stabilitu zbarvení chromoforu. V potravinářství, je tento jev považován za velmi důležitý, neboť barva je jedním z hlavních kvalitativních faktorů produktu.

Kopigmenty jsou bohaté na π elektrony, které jsou schopny vázat flavyliový ion, který má spíše méně elektronů. Jedná se o ochranu před nukleofilním útokem vody a jinými sloučeninami jako jsou peroxidy a oxid siřičitý, ty se vážou do polohy 4 ve flavyliovém iontu.

Voda se váže do polohy 2 a má za následek vznik karbinolové pseudobáze a následnou ztrátu barvy.

Komplexy anthokyanů se strukturou *o*-difenolů s kovy (Al, K, Fe, Cu, Ca, Sn aj.) mohou stabilizovat barvu produktů, ale také způsobit nežádoucí změnu zbarvení. Např. komplexy s cínem vznikající v konzervách mění červenou barvu plodů (např. jahod) na fialovou.

Reakce anthokyanů s kopigmenty lze provést pěti různými způsoby v závislosti na interagující sloučenině (Obrázek 5).



Obrázek 5: Interakce anthokyanů [5]

asociace^(A), *intramolekulární kopigmentace*^(B), *kovový komplex*^(C), *intermolekulární kopigmentace*^(D)

Pokud je kopigmentem další anthokyan, jedná se o asociaci nebo intramolekulární kopigmentaci (Obrázek 5, A a B).

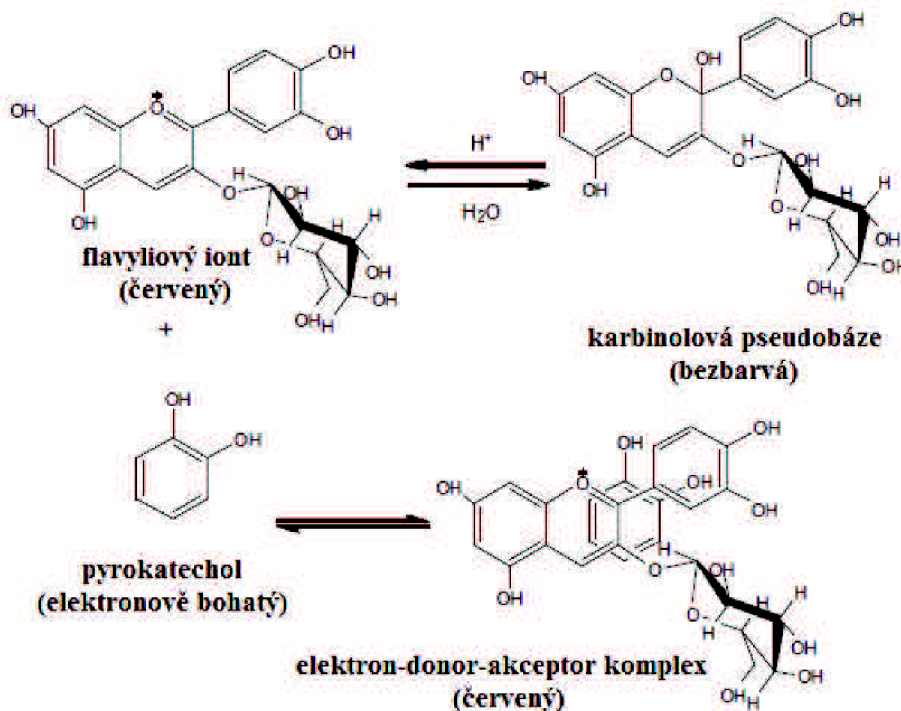
Při interakci s kovem, vzniká komplexotvorná reakce (Obrázek 5, C). V případě reakce kopigmentu s volnými elektronovými páry, probíhá intermolekulární kopigmentace (Obrázek 5, D). Během nejsložitějších reakcí může být kopigmentace uskutečněna navázáním aglykonu, cukru, kopigmentu a protonů, všech ve stejnou dobu.

Pokud je kopigmentem další fenolická sloučenina, interakce je přechodná, kvůli nedostatku chemických vazeb. Přechodná interakce je výsledkem chemického jevu známého jako π - π interakce. Díky tomu v kruzích spojených slabou vazbou, je elektronová hustota převedena z elektron-bohatšího kruhu na elektron-chudší kruh; tak jako je flavyliový iont v anthokyanech pozitivně nabit a je pak vhodným kandidátem pro tvorbu komplexů, díky přenosu náboje, s elektron-bohatými substráty.

Výsledná kopigmentace je založena na dvou efektech:

- 1) Tvorbě π - π komplexu, což způsobuje změnu spektrálních vlastností molekul flavyliového iontu, zvýšení absorpční intenzity a vlnové délky.
- 2) Stabilizace flavyliové struktury π - π komplexem přemísťuje rovnováhu takovým způsobem, že se zvyšuje červená barva (Obrázek 6).

Rozsah kopigmentačního efektu je tedy závislý na pH, neboť při nízkých hodnotách pH, jsou všechny anthokyany ve flavyliové formě a při vysokých hodnotách pH, je anthokyanin v karbinolové pseudobázové formě, která je bezbarvá. Kopigmentační efekt je patrný u slabě kyselého prostředí (pH 4-6), kde anthokyany existují ve svých bezbarvých formách [5, 8].



Obrázek 6: Ukázka stabilizace anthokyanu tvorbou komplexu s fenolovou sloučeninou [5]

2.2.2.4 *Působení kovových iontů*

Různorodost barev byla původně vysvětlena tvorbou chelátů mezi kovy a flavyliovými solemi. I přes nízký zájem v potravinářském průmyslu o anthokyan-kovové komplexy, tato interakce představuje uskutečnitelnou alternativu pro stabilizaci barvy, zejména pokud zapojené kovy nepředstavují riziko pro zdraví nebo dokonce, že jsou součástí základních minerálů ve stravě.

Jedna z hlavních vlastností anthokyanů a anthokyanidinů s o-di-hydroxylovými skupinami v kruhu B (Cy, Dp, Pt), je právě jejich schopnost tvořit kov-anthokyaninové komplexy.

Některé studie o stálosti barev v rostlinách také naznačují, že modrá barva je důsledkem komplexace mezi anthokyanany a některými kovy, jako je Al, Fe, Cu a Sn, nebo Mg a Mo [5].

2.2.3 **Využití anthokyanů v potravinářském průmyslu**

Anthokyanany izolované z přírodních zdrojů se používají jako potravinářská barviva po dobu delší než sto let a ve formě koncentrátů různých šťáv mnohem déle. Jsou vhodné jen pro kyselé potraviny, neboť jejich barva je intenzivní pouze v prostředí o pH nižším než 3,5.

Nejvíce využívaná jsou anthokyanová barviva získaná z hroznů révy vinné (slupek nebo sedimentů), obsahují 0,3-7,5 g/kg. Bohatým zdrojem jsou také plody bezu černého (bezinky), které obsahují 2-10 g/kg, nebo aronie černoplodá obsahující 10 g/kg. Dalšími zdroji jsou hlávky červeného zelí, květy ibišku, některé sladké brambory, pomeranče s červenou dužninou, listy a semena červených odrůd kukuřice.

V souvislosti s použitím pro potravinářská aditiva byla u anthokyanových barviv zkoumána jejich toxicita a mutagenita, která nebyla prokázána nebo byla velmi nízká [6].

Zaměření nedávných výzkumů potvrdilo, že anthokyanany patří ke zdraví prospěšným antioxidačním látkám. Díky tomu se jejich používání, jako přírodní barviva v různých produktech, výrazně zvyšuje.

Vylepšení extrakčních, purifikačních a identifikačních metod nejprve v laboratorním a poté v poloprovozním měřítku, bude mít v blízké budoucnosti vliv na cenu těchto barviv a jejich standardů, stejně jako na zavádění nových metod pro ověřování potravinových výrobků a objevování sofistikovaného klamání spotřebitele [5].

Anthokyanany lze přidávat do potravin, neboť se řadí mezi přídatné látky. Označují se kódem E163. Při výrobě potravin lze použít pouze přídatné látky, které byly pro použití v potravinách EU schváleny příslušnými právními předpisy. V České republice stanovuje Vyhláška č. 4/2008 Sb. druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin [9, 10].

2.2.4 **Metody stanovení anthokyanů**

Obsah anthokyanových pigmentů má rozhodující vliv na barvu a kvalitu čerstvého a zpracovaného ovoce a zeleniny. Přesné stanovení anthokyanů spolu s jejich degradačními indexy je proto velmi užitečné v potravinářských technologiích k hodnocení kvality surovin a zpracovaných potravin [6].

Kompletní analytické procesy metod stanovení anthokyanových sloučenin zahrnují také procesy extrakce anthokyanů z rostlinných tkání, izolace a čištění anthokyanů ze surového rostlinného extraktu a konečně, strukturní studie nebo identifikaci každého jednotlivého anthokyanu.

Analýza anthokyanů je komplikovaná, neboť anthokyany podléhají strukturním transformacím a komplexotvorným reakcím. Také je obtížné tyto sloučeniny jednotlivě analyzovat, protože mají podobné reakční vlastnosti a strukturu jako flavonoidy (Obrázek 3).

Anthokyanové standardy, které umožňují kvantifikaci pigmentů, nejsou běžně dostupné a není snadné je izolovat z rostlinných materiálů v čisté formě, pro použití ve výzkumu, hlavně díky jejich, již zmiňované, nestabilitě.

Existuje celá řada různých metod přípravy vzorků. Tyto techniky jsou však závislé na použité analytické metodě. Nicméně, každá extrakční technika zahrnuje sušení rostlinného materiálu s následnou extrakcí alkoholem za studena, z důvodu degradačních vlastností anthokyanů při vysokých teplotách. Extrakční roztok by měl být slabě kyselý k zachování červeného flavyliového kationtu, který je stabilní ve vysoce kyselém prostředí. Při okyselování extrakčních rozpouštědel se však nepoužívají silné kyseliny, protože by mohlo dojít k hydrolýze acylovaných anthokyanů [11].

K historickým separačním technikám anthokyanů patří papírová chromatografie (PC) a chromatografie na tenké vrstvě (TLC). Spektrální charakteristika anthokyanů poskytuje velmi užitečné kvalitativní a kvantitativní informace o daném pigmentu. UV/VIS spektrofotometrie je, i díky své jednoduchosti a nízkým finančním nákladům na provedení, jednou ze základních technik využívaných k identifikaci anthokyanů. Další metodou stanovení je HPLC s detektorem s diodovým polem. Problémem je však získat referenční sloučeniny a značné nevýhody představují i spektrální podobnosti anthokyanů. Proto se pro identifikaci těchto barviv staly preferovanými technikami HPLC s UV detektorem, HPLC s hmotnostní detekcí a HPLC spojená s nukleární magnetickou rezonancí. Další běžnou technikou využívanou pro separaci anthokyanů ze surového rostlinného extraktu je kapilární elektroforéza (CE) [5, 11].

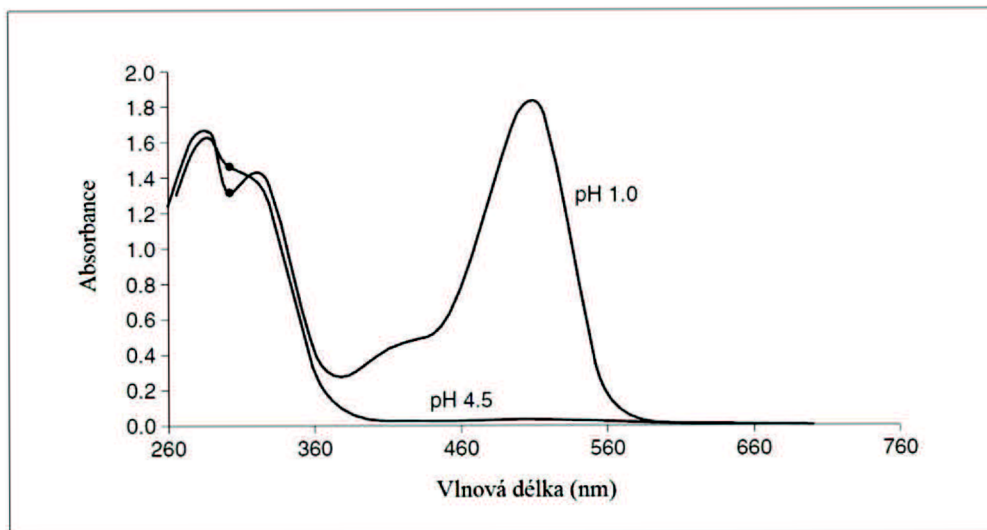
2.2.4.1 Historické separační techniky

První pokusy o separaci anthokyanových barviv byly založeny na adsorpci anthokyanů na chromatografický papír (PC) nebo jiný vhodný adsorbent (TLC). Papírová chromatografie byla jednou z prvních metod používaných pro izolaci a čištění některých anthokyanů. V závislosti na konkrétním vzorku a různých mobilních fázích tato chromatografie umožňovala dostatečné rozlišení pro některé směsi pigmentů. PC však neumožňovala získat větší množství čistých anthokyanů. Další nevýhodou této metody byla dlouhá doba na vyvinutí chromatogramu. Oproti tomu tenkovrstvá chromatografie (TLC) umožňovala lepší rozlišení, kratší eluční dobu a na analýzu se používalo menší množství vzorku. Bylo nutné však používat referenční sloučeniny, kvůli rozdílné pohyblivosti analytů v různých systémech rozpouštědel. Navzdory jejich nevýhodám se PC a TLC stále využívají jako rutinní techniky v některých laboratořích, hlavně díky nízkým finančním nákladům na provedení a stálému vývoji lepších stacionárních a mobilních fází [11, 12].

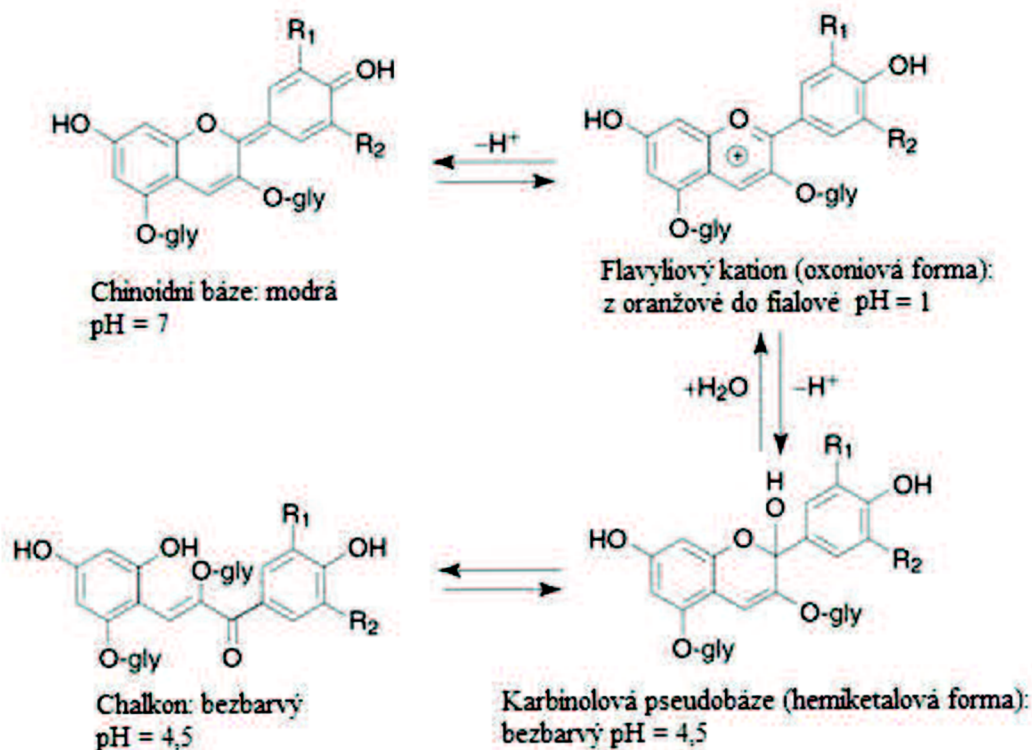
2.2.4.2 pH-diferenciální metoda

Spektrofotometrická metoda stanovení koncentrace anthokyanových pigmentů se nazývá pH-diferenciální metoda. Podstatou této metody je reverzibilní změna struktury anthokyanových pigmentů se změnou pH, což se projevuje nápadně odlišnou absorbcí.

Barevná oxoniová forma převažuje při pH 1,0 a bezbarvá hemiketalová forma při pH 4,5. pH-diferenciální metoda je založena na této reakci a umožňuje přesné a rychlé měření celkových monomerních anthokyanů a to i za přítomnosti polymerizovaných, degradovaných pigmentů a dalších rušivých sloučenin [1].



Obrázek 7: Spektrální charakteristika čistého anthokyanu při pH pufrů 1,0 a 4,5 [6]
Jedná se o anthokyan z ředkvičky (pelargonidin-3-soforosid-5-glukosid)



Obrázek 8: Převažující přítomné strukturální formy anthokyanů při různých hodnotách pH [6]

2.2.4.3 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC) je separační metoda používaná pro kvalitativní a kvantitativní analýzu látek. HPLC se dále používá k identifikaci jednotlivých přírodních látek z rostlinných matic pomocí spřažených technik, jako jsou HPLC s UV detektorem, HPLC s hmotnostní detekcí a HPLC spojená s nukleární magnetickou rezonancí.

Neexistuje jediný standardní postup pro analýzu anthokyanů pomocí HPLC. Spíše existují různé obecné trendy (typ kolony, podmínky separace atd.), které mohou být použity při charakterizaci anthokyanů ze stejného rostlinného materiálu.

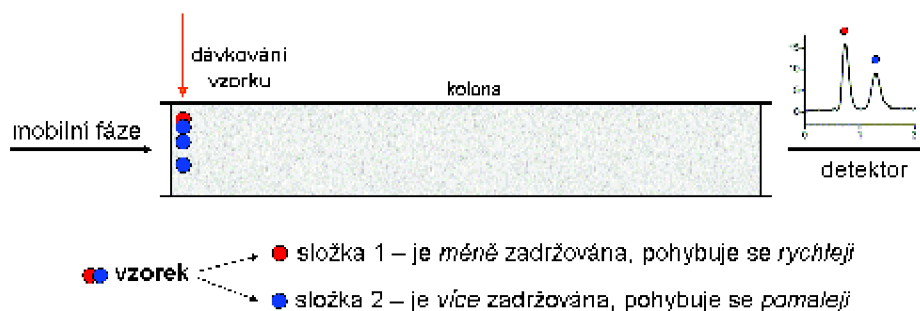
Většina chromatografických systémů anthokyanů používá reverzních fází (RPC). Použité stacionární fáze mají nepolární charakter a mobilní fáze má polární charakter. Stacionární fáze často tvoří reverzní sorbent C18, který má na povrchu silikagelového porézního jádra navázány alkylové řetězce s 18 uhlíky. Omezením silikagelových kolon je poměrně úzká oblast pH (2 až 7), ve které jsou tyto kolony stabilní. Proto se dnes více používají polymerní náplně kolon, které jsou stabilní v širším rozsahu pH.

Mobilní fáze je obvykle gradient, jehož základ tvoří voda, kyselina a organický modifikátor. Při stanovení anthokyanů se využívají gradientové systémy rozpouštědel acetonitrilu a vody nebo směsi methanolu a vody s malým množstvím kyseliny. Tato rozpouštědla jsou velmi oblíbená díky své kompatibilitě s gradientovým systémem a různými detekčními technikami spojenými s HPLC pro identifikaci pigmentů. Nejčastěji používané kyseliny jsou fosforečná, chloristá, octová a mravenčí. Malé množství kyseliny je nezbytné pro stabilizaci anthokyanů a tvorbu ostrých píků. Pro získání reprodukovatelných výsledků musí být pH mobilní fáze a teplota na koloně kontrolovány, kvůli nestabilitě anthokyanových barviv při změně pH a teploty prostředí. K dosažení optimálních výsledků, se používají kyselé mobilní fáze, s pH nižším než 2,0. Nízké pH udržuje anthokyanu ve stabilnější flavyliové formě a také snižuje chvostování píku. V kyselém prostředí je flavyliový kationt zbarvený do červena a poskytuje charakteristické absorpční maximum při 520 nm. Při této vlnové délce nedochází k ovlivňování jinými fenolovými sloučeninami přítomnými v rostlinném extraktu. Právě díky unikátnímu absorpčnímu maximu mohou být anthokyanu přesně identifikovány a kvantifikovány z velmi surových rostlinných extraktů.

V chromatografii na reverzní fázi, retenční čas analytů klesá s jejich rostoucí polaritou, která odpovídá vzrůstajícímu počtu hydroxylových skupin na flavyliovém iontu. Eluční pořadí anthokyanů je následující: delfinidin, kyanidin, petunidin, pelargonidin, peonidin a malvidin. Díky reverzní fázi budou mít diglykosilované anthokyanu nejnižší retenční čas, následované monoglykosilovanými anthokyanu, aglykony a nakonec acylovanými anthokyanu.

Systémy s normálními fázemi, nebo ty, které používají neupravený silikagel, nejsou pro separaci anthokyanů efektivní, hlavně kvůli vysoké polaritě těchto sloučenin [11].

Princip chromatografického procesu: Kapalinovým chromatografem protéká mobilní fáze, která je ze zásobních lahví vedena přes vysokotlakou pumpu do kolony, dále do detektoru a odpadu. Dávkovacím ventilem je do proudu mobilní fáze nadávkován vzorek. Vzorek je poté unášen proudem mobilní fáze do chromatografické kolony. Na koloně se nejprve utvoří směsný eluční pás a poté dochází k separaci jednotlivých složek směsi. Po výstupu látky z kolony indikuje detektor její přítomnost v eluátu. Signál z detektoru je zaznamenáván pomocí počítače a zpracován v podobě chromatogramu [13].



Obrázek 9: Princip chromatografického procesu [14]

2.2.4.4 HPLC s UV detektorem

Nejčastěji používaná detekční metoda pro HPLC je UV/VIS spektrofotometrie. Anthokyany mají specifické absorpční maximum při 520 nm, které stává tyto sloučeniny stranou od ostatních flavonoidů rostlinného extraktu. UV/VIS spektrofotometrie nebyla použita pro identifikaci anthokyanů až do zavedení technologie s diodovým polem, která umožnila vznik knihoven s UV/VIS spektry, potřebných při identifikaci různých píků. HPLC s detekcí s diodovým polem (HPLC-UV-DAD) provádí kompletní spektrofotometrické skenování každého eluovaného píku, čímž poskytuje chromatogram s jednotlivými anthokyanami. Tyto chromatogramy mohou být následně využity k porovnávání s jinými spektry anthokyanů, tedy pro jejich identifikaci. Spektrální charakteristiky jednotlivých anthokyanů souvisí s hydroxylovými skupinami na aglykonové struktuře. Různé substituované cukry ve struktuře anthokyanů nemají vliv na spektrální charakteristiky, ale významně ovlivňují retenční čas sloučenin. Acylované anthokyaniny mají výrazně vyšší retenční čas v porovnání s neacylovanými anthokyaniny [11].

2.2.4.5 Hmotnostní spektrofotometrie MS

Hlavním účelem provedení analýzy anthokyanů pomocí MS bylo objasnění jejich struktury. V poslední době se techniky, jako je HPLC-MS, APCI-MS, FAB-MS a ESI-MS staly velmi používanými a výkonnými identifikačními metodami anthokyanů. Spojení HPLC s MS má významný vliv na kvantitativní a kvalitativní stanovení anthokyanů.

Hmotnostní spektroskopie je citlivá metoda molekulární analýzy, která poskytuje výborné selektivní a identifikační výsledky jednotlivých sloučenin ve směsi. Analýza specifických typů sloučenin vyžaduje vhodnou ionizační techniku pro převedení molekulárního iontu do přístroje. Bylo vyvinuto mnoho ionizačních metod pro netěkavé nebo termodynamicky nestabilní vzorky, jako jsou právě anthokyaniny. K nejvhodnějším ionizačním technikám pro anthokyaniny se řadí ionizace ostřelováním vzorku rychlými atomy (FAB), ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a elektrosprejem nebo termosprejem (ESI). Těmito technikami se zabrání odpařování vzorku a následné ionizaci, přičemž dodávají energii do pevného nebo kapalného vzorku takovým způsobem, aby byly přímo tvořeny plynné ionty. Díky tomu, lze získat velmi zjednodušená spektra.

Dnes je nejvíce využívaná metoda HPLC-MS-ESI. ESI je mírná ionizační metoda. Převodu iontů z kapalné fáze do vakua je dosaženo rychlým odsušením mikrokapiček. Je-li proces odsušení dostatečně rychlý, povrchový náboj kapének postačí k převodu iontů z roztoku do vakua bez nutnosti dodání vnější energie. Metoda je vhodná pro malé rostlinné metabolity, jimiž jsou anthokyany. Z hmotnostních analyzátorů se používá průletový analyzátor (TOF), kvadrupólový hmotnostní filtr a nebo kvadrupólová hmotnostní past [5, 11].

2.2.4.6 Nukleární magnetická rezonance NMR

Nukleární magnetická rezonance (NMR) spojená s HPLC je používána pro objasnění struktury anthokyanů z rostlinných extraktů. V současnosti je HPLC-NMR metoda omezena jen na ^1H NMR spektra nebo za určitých podmínek na ^{13}C NMR spektra. Měření ^1H spektra může probíhat za konstantního průtokového režimu. Tento režim vyžaduje poměrně vysoké koncentrace rostlinného extraktu (alespoň 1 mg v objemu nástříku). Spektrum se získává plynule během separace a poskytuje 2-D NMR spektrum s nízkou citlivostí. Pro provedení přesnějšího měření nebo 2-D korelačních experimentů je výhodnější režim se stopováním průtoku, který zastaví tok rozpouštědla na krátký čas. Přesnějším měřením je možné identifikovat acylované anthokyany, za účelem stanovení pozice glykosidu v anthokyanové struktuře. NMR se také velmi využívá pro identifikaci reakčních produktů anthokyanů s jinými sloučeninami, jako jsou deriváty kyseliny skořicové, peroxy radikály, katechiny nebo flavonoly [5, 11].

2.2.4.7 Kapilární elektroforéza (CE)

Poměrně novou a slibnou technikou využívanou k separaci, identifikaci a kvantifikaci anthokyanů je kapilární elektroforéza (CE). Používá se hlavně díky vysoké rozpustnosti anthokyanů ve vodě. První anthokyanová analýza pomocí CE byla popsána v roce 1996. Při této analýze byla použita tavená křemenná kapilára, boritanový pufr (pH 8) a detektor s diodovým polem. Později bylo pro kvantitativní stanovení anthokyanů např. ve víně použito mnoho variant této techniky, jako alternativy k HPLC [5].

Kapilární elektroforéza se vyznačuje vynikající hmotnostní citlivostí, vysokým rozlišením, nízkou spotřebou vzorku a minimální produkcí odpadu. Nejčastěji používanou metodou pro separaci anthokyanů je kapilární zónová elektroforéza (CZE). Molekuly se separují na základě dvou transportních jevů, a to elektroforetické migrace iontů a elektroosmotického toku kapaliny. Elektroforetická migrace je pohyb nabitých molekul v elektrickém poli. Elektroosmotický tok je tok elektrolytu způsobený nábojem vnitřní stěny kapiláry a aplikovaným potenciálem. Různé molekuly se pohybují různou rychlostí a různými směry podle poměru velikosti své hmoty a svého náboje. K separaci neutrálních molekul nedochází, nýbrž jsou unášeny jako jeden pás. Metoda je tedy použitelná pouze pro analýzu nabitých částic [1, 11].

V dnešní době se separují anthokyany metodou, která používá jako základní elektrolyt tetraboritanový pufr o pH = 8,4 s 15 objemovými procenty methanolu. Methanol zde působí jako modifikátor, který zvyšuje citlivost metody. Separace molekul probíhá za kladného polárního režimu a kladného elektroosmotického toku s tokem molekul ve směru od anody ke katodě. Analyty jsou sledovány UV/VIS detektorem při vlnové délce 599 nm.

Elektrochromatogram poskytuje modré chinoidalové formy anthokyanů. Pro kvantitativní účely stanovujeme kalibrační křivku používající malvidin 3-glukosid jako standart.

Použitelnost zásaditého základního elektrolytu je limitována nestabilitou anthokyanů v bazickém prostředí. Je proto výhodnější použít pro separaci anthokyanů kyselý elektrolyt a nastavit separační systém na opačný program, tedy pohyb molekul od katody k anodě. Kyselé prostředí zajišťuje setrvání anthokyanů ve flavyliových formách.

Další alternativa, používaná pro efektivní separaci anthokyanů, je micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC). Princip separace je založen na dělení nenabitých anthokyanů v neutrálním prostředí mezi vodnou fází a micelární pseudofází. Hnacím mechanismem separace je rozdílná lipofilita analytů. Pomocí tohoto režimu, byl vyvinut způsob, jak oddělit současně 6 anthokyanů.

Všechny kyanidinové deriváty anthokyanů, byly odděleny také pomocí dodecyl sulfátu sodného (SDS), ve fosfát-boritanovém pufru při pH 7,0, s UV/VIS detekcí při absorpčním maximu 280 a 560 nm. Přídavkem SDS se vytvoří negativně nabitě micely, které anthokyanům poskytují chemickou stabilitu ve vodném prostředí. Přestože mnoho separací pomocí MEKC používá kratší vlnovou délku 214 nm, optimální detekční oblast anthokyanů se nachází při 280 nebo 560 nm [11].

2.3 Vitamin C

Kyselina askorbová, známá také jako vitamin C byla objevena roku 1928. Za objev chemické struktury kyseliny askorbové dostal Nobelovu cenu americký biochemik maďarského původu Dr. Szent-Györgyi v roce 1937. Zjistil, že struktura kyseliny askorbové je velmi podobná struktuře cukru glukosy. Většina živočichů si tedy vytváří tuto kyselinu z glukosy, jen morčata, opice, netopýři a člověk to nedokáží, proto jsou odkázáni na příjem vitamin C z potravy.

Za výborné zdroje vitaminu C se považují čerstvá zelenina a ovoce. Nejznámějšími ovocnými zdroji jsou citrusové plody (citrony, pomeranče, grepy). Vysoká koncentrace kyseliny askorbové je obsažena také např. v jahodách, černém rybízu, datlích a velmi bohatým zdrojem vitaminu C jsou šípky. Mezi zeleninu s významným obsahem vitaminu C patří např. kadeřavá petržel, brokolice, červená a zelená paprika, květák, zelí, růžičková kapusta. Živočišné potraviny obsahují velmi málo vitaminu C, kromě jater, ve kterých se u zvířat kyselina askorbová syntetizuje. Přírodní vitamin C je dostupný i jako doplněk stravy, většinou vyrobený z šípků, papriky nebo citrusového ovoce. Ve větším množství může být vyráběna syntetizovaná kyselina askorbová a to z kukuřičného sirupu, který má vysoký obsah dextrosy, nebo ze stromovité palmy ságovníku [15, 16].

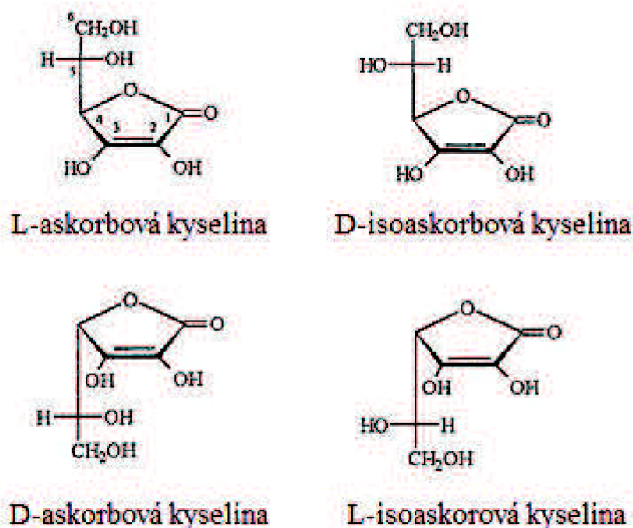
Vitamin C je nezbytný k životu a v lidském těle plní mnoho důležitých funkcí. Je velmi polární, proto je rozpustný ve vodě, dále citlivý na teplo a vysoce oxylabilní. V přírodě se nachází ve dvou formách, kyselina askorbová jako redukováná forma a kyselina dehydroaskorbová jako oxidovaná forma. Kyselina askorbová má silné redukční vlastnosti, lehce se oxiduje na kyselinu dehydroaskorbovou a vytváří tím tak v přírodě důležitý oxidačně-redukční systém.

V potravinách rostlinného původu je zpravidla 90–95 % vitaminu C přítomno ve formě askorbové kyseliny, zbytek tvoří dehydroaskorbová kyselina [8].

2.3.1 Struktura

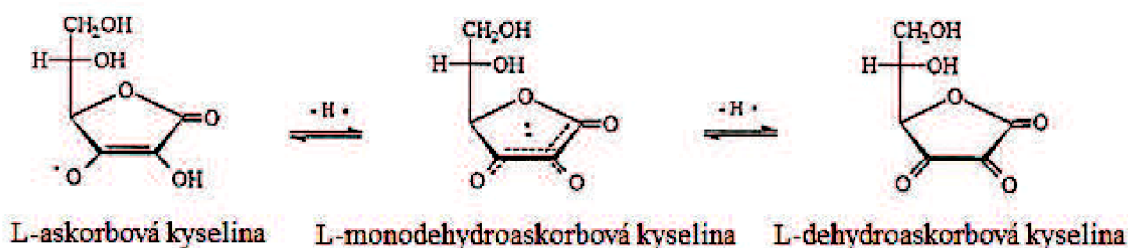
Kyselina askorbová je základní biologicky aktivní sloučenina vitamínu C. Tato kyselina existuje ve čtyřech stereoisomerních formách a pouze L-askorbová kyselina vykazuje aktivitu vitamínu C. Její isomer D-askorbová kyselina a druhý pár enantiomerů, L a D-isoaskorbová kyselina aktivitu vitamínu C nevykazují. Ve struktuře askorbové kyseliny je mezi druhým a třetím uhlíkem endiolové uspořádání, které poskytuje silné redukční účinky.

Právě díky svým redukčním a antioxidačním účinkům jsou L-askorbová a L-isoaskorbová kyselina využívány v potravinářském průmyslu. D-forma kyseliny askorbové nemá žádnou nutriční hodnotu, proto se jako potravinářská surovina nevyužívá [8, 17, 18].



Obrázek 10: Struktura askorbové kyseliny [19]

Vitamin C není pouze kyselina askorbová, ale celý reversibilní redoxní systém, který zahrnuje L-askorbovou kyselinu, L-monodehydroaskorbovou kyselinu (L-askorbylradikál) a L-dehydroaskorbovou kyselinu [8].



Obrázek 11: Oxidace kyseliny askorbové [19]

L-monodehydroaskorbová kyselina je produktem jednoelektronové oxidace kyseliny L-askorbové a dvouelektronovým produktem oxidace je kyselina L-dehydroaskorbová. Askorbová kyselina a askorbylradikál se v roztocích o fyziologickém pH vyskytují ve své aniontové formě [8].

2.3.2 Význam v lidském organismu

V organismu se vitamin C podílí především na probíhajících hydroxylačních reakcích. Dále se účastní biosyntézy mukopolysacharidů, prostaglandinů, má vliv na absorpci iontových forem železa a transport železa, také stimuluje transport sodných, chloridových a pravděpodobně i vápenatých iontů, uplatňuje se v metabolismu cholesterolu, drog a v řadě dalších reakcí.

Mezi důležité reakce se řadí i reakce s aktivními formami kyslíku (resp. s volnými radikály) a reakce s oxidovanými formami vitaminu E, což svědčí o antioxidačních vlastnostech vitaminu C. Tyto reakce zabezpečují ochranu vitaminu E a lipidů membrán před oxidací. Ochrannou funkci má i pro labilní formy listové kyseliny. Inhibuje také tvorbu nitrosaminů a působí tak jako modulátor mutagenese a karcinogeneze. Mnoho dalších aktivit vitaminu C je dosud známo jen částečně [8].

2.3.3 Význam z výživového hlediska

Doporučovaný denní příjem vitaminu C se pohybuje kolem 80 mg [20]. U oslabených a nemocných jedinců se mohou dávky vitaminu zvyšovat. Celkový denní doporučený příjem vitaminu C může být zajištěn pouze příjmem z vhodných potravin, jako jsou zelenina a ovoce.

Nedostatek vitaminu C (hypovitaminosa) se projevuje řadou nespecifických příznaků, nejčastěji se jedná o takzvanou jarní únavu, která má příznaky celkového oslabení organismu.

Dlouhodobý nedostatek vitaminu C (avitaminosa) způsobuje skorbut (kurděje) s kterými se v dnešní době již nesetkáme, a tak se nedostatku vitaminu C usuzuje špatné hojení ran, časté nachlazení a infekční nemoci, nebo onemocnění plic. Lze tedy říct, že vitamin C zvyšuje imunitu a odolnost organismu a tím snižuje riziko nemocí z nachlazení i riziko vzniku rakoviny. V současné době se toto všechno připisuje jeho pozitivním antioxidačním účinkům.

Oxidoreduktázy jsou považovány za antivitamin C, patří sem např. askorbát oxidasa, askorbátperoxidasa, dehydroxyaskorbát reduktasa, superoxiddismutasa [8, 16, 21].

Tabulka 4: Doporučená denní dávka vitaminu C – mezinárodně používané hodnoty [16]

	Vitamin C (mg)
Kojenci 0-6 měsíců	40
Kojenci 7-12 měsíců	50
Děti 1-3 roky	15
Děti 4-8 roky	25
Muži 9-13 let	45
Muži 14-18 let	75
Muži 19-30, 31-50, 51-70, nad 70 let	90
Ženy 9-13 let	45
Ženy 14-18 let	65
Ženy 19-30, 31-50, 51-70, nad 70 let	75
Těhotné pod 18 let	80
Těhotné 19-30, 31-50 let	85
Kojící matky pod 18 let	115
Kojící matky 19-30, 31-50 let	120

2.3.4 Metody stanovení vitamínu C

Současný zájem o simultánní analýzu kyseliny askorbové (AA) a dehydroaskorbové (DHA) v potravinách se výrazně zvýšil, neboť obsah vitamínu C v plodech (součet obsahu kyseliny askorbové a dehydroaskorbové) se používá jako index k porovnání kvality ovoce. Z důvodu odlišným vlastností těchto dvou kyselin je stanovení poměrně obtížné. Hlavními problémy jsou selektivita a citlivost metody, výběr vnitřních standardů, retence AA a DHA, výběr vhodného detektoru a stabilita kyselin v roztoku.

Bylo vyvinuto mnoho metod založených na reverzibilní redoxní reakci oxidované kyseliny askorbové/redukované kyseliny dehydroaskorbové. Tyto metody však nezajišťovaly specifčnost a podléhaly interferenci dalších redukčních činidel. Jedná se zejména o spektrofotometrické nebo enzymatické metody, které by mohly interferovat analyty (např. ionty železa nebo mědi, dále cukry nebo kyselina glukuronová u metod spektrofotometrických a citrát nebo peroxid vodíku u enzymatických metod).

Obecně lze říci, že nejvíce preferované analytické metody pro stanovení celkového vitamínu C využívají HPLC, protože poskytují vyšší selektivitu než spektrofotometrické, titrační nebo enzymatické metody a obvykle není potřeba derivatizace. V závislosti na použitém detekčním systému jsou HPLC metody obecně citlivější. Nejběžněji používanou detekční technikou je UV detekce. Kyselina askorbová absorbuje UV záření silně při 254 nm (245–265 nm v závislosti na pH). Kyselina dehydroaskorbová absorbuje dobře při 185 nm, avšak nad 220 nm je absorbance slabá. Pro simultánní stanovení obou kyselin je třeba redukovat kyselinu dehydroaskorbovou na askorbovou. Další velmi používanou detekční technikou je elektrochemická detekce (ED), kterou lze detekovat pouze kyselinu askorbovou, protože kyselina dehydroaskorbová je elektrochemicky inaktivní. Také se používá fluorescenční detekce (FD), která vyžaduje derivatizaci, nebo hmotnostní spektrometrie (MS), která je nejcitlivější a nejvíce selektivní. Provozní náklady na používání MS jsou však poměrně vysoké. Malé množství metod pro stanovení AA a DHA, využívá vnitřních standardů. Díky tomu lze stanovovat analyty v komplexních maticích, včetně potravin a biologických tekutin.

Kyselina askorbová je velmi malá polární molekula, kterou je obtížné udržet v konvenční reverzní fázi chromatografického systému a separovat z mrtvého objemu. Tento fakt je důležitý zejména v bio-analytickém stanovení, kde jsou balastní látky z biologické matrice eluovány s mrtvým objemem, nebo na začátku chromatogramu.

Mobilní fáze jsou často velmi složité. Obsahují více než dvě složky a skládají se z různých modifikátorů nebo činidel.

K principům stanovení askorbové kyseliny lze zařadit chromatografii na reverzní fázi, iontovýměnnou a iont-párovou chromatografii a chromatografii s iontovou výlukou. V poslední době se začala používat i kapalinová chromatografie založená na hydrofilních interakcích (HILIC) [22].

2.3.4.1 Chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC)

Pro stanovení AA a DHA jsou používány hlavně stacionární fáze s oktadecylovaným silikagelem (ODS). Při analýze však dochází ke špatnému rozlišení askorbové kyseliny a mrtvého objemu. K lepší separaci se používá mobilní fáze s velkou převahou vody (někdy i 100 %) obvykle v anorganické nebo organické kyselině nebo v anorganickém pufru. Tyto mobilní fáze by měly mít nízké pH, neboť v kyselém pH jsou neutrální formy kyseliny lépe udržovány v ODS stacionární fázi.

Mobilní fáze s pKa nižším, než má kyselina askorbová (pKa 4,17) se používají u chromatografie na reverzní fázi s iontovým potlačením. Pro stanovení organických kyselin pomocí RP-HPLC s iontovým potlačením se nejvíce používá kyselina chloristá.

Při analýze AA a DHA se používají mobilní fáze s kyselinou trifluoroctovou, kyselinou sírovou nebo fosforečnou, s velmi nízkým pH 2.

Jedna z hlavních nevýhod je použití 100% koncentrace vody v mobilní fázi, neboť mobilní fáze, které neobsahují organický modifikátor, mohou negativně ovlivnit účinnost separace na C18 stacionární fázi. Další nevýhodou je nízké pH, které může urychlit degradaci kolon na bázi silikagelu v důsledku rozpouštění oxidu křemičitého [22].

2.3.4.2 Iont-párová chromatografie

Iont-párová chromatografie se pro stanovení AA a DHA používá velmi zřídka. Mobilní fáze tvoří často komplexní směsi, složené z pěti někdy i více složek. Při analýze AA a DHA se používají iont-párová činidla a anorganické pufrů jako přídatné látky. Používání anorganických pufrů však způsobuje mnoho problémů, protože se mohou ve formě solí usazovat v některých částech systému, čímž může dojít k selhání celého systému. Reprodukovatelnost a selektivita této metody je velmi nízká, proto není iontopárová chromatografie, pro mnoho nevýhod, příliš vhodnou metodou pro stanovení vitamínu C [22].

2.3.4.3 Iontovyměnná chromatografie

Iontovyměnná chromatografie byla jednou z prvních metod používanou k analýze askorbové kyseliny. Kyselina askorbová je slabá organická kyselina a může být dobře zachycena silným aniontovým měničem. Používají se i metody s amino-modifikovanou stacionární fází, kde amino skupina vystupuje jako slabý aniontový měnič. Jako mobilní fáze se používá anorganický pufr, nebo kyselina při nízkém pH. Pro analýzu AA a DHA se však tato metoda neuchytila [22].

2.3.4.4 Chromatografie s iontovou výlukou

Tato metoda byla využívána pro analýzu AA a DHA hlavně v letech 1990. V dnešní době se tento typ chromatografie používá už méně. Stacionární fáze jsou na bázi sulfonovaných sférických PS/DVB (poly(styren-divinylbenzen)) pryskyřic v různé iontové formě. Tyto polymerní stacionární fáze jsou stabilní při velmi nízkých hodnotách pH roztokům. Mobilní fázi tvoří anorganická kyselina (např. kyselina sírová, kyselina fosforečná nebo sulfonová) bez organického modifikátoru. Retence na těchto kolonách je kontrolována elektrostatickými odpuzivými silami, hydrofóbními interakcemi a efektem iontové výluky. Na stacionární fázi iontová funkční sulfoskupina SO_3^- odpuzuje ionty se stejným nábojem elektrostatickou silou, čímž jim zamezuje vnikat do porézního systému.

Silně ionizované roztoky jsou vylučovány ze systému pórů. Neutrální roztoky nejsou ovlivňovány elektrostatickými silami, vstupují do pórů a rozdělují se v důsledku hydrofóbních interakcí. Slabě ionizované roztoky (organické kyseliny s AA a DHA) jsou eluovány mezi nimi, v důsledku elektrostatických sil a parciální penetrace do pórů, kde se objevují hydrofóbní interakce. Retence je také ovlivněna velikostí molekul.

Porovnáním s iontovyměnnou chromatografií a chromatografií na reverzní fázi, je tato metoda ke stanovení vitamínu C použitelnější [22].

2.3.4.5 *Kapalinová chromatografie s hydrofilní interakcí (HILIC)*

HILIC je alternativou ke konvenčnímu HPLC s normálními nebo reverzními fázemi. Tato metoda je vhodná pro analýzu malých polárních molekul, které jsou slabě zadržovány ve stacionární fázi a jsou eluovány s mrtvým objemem. HPLC s normálními fázemi byla nahrazována metodou HILIC hlavně kvůli špatné reprodukovatelnosti, nízké rozpustnosti polárních látek v mobilní fázi a velkých obtížích při spojení HPLC s MS detekcí.

Retence analytu se děje na základě jeho rozdělení mezi vodou obohacenou vrstvou nehybného eluentu na hydrofilní stacionární fázi a relativně hydrofobní část elučního činidla, které je složeno obvykle z 5-40 % vody v acetonitrilu. Mobilní fáze tedy obsahuje vysoké procento organického rozpouštědla a je doplněna o malé procento vody a těkavého pufru. Vodou obohacená vrstva kapaliny je usazena uvnitř stacionární fáze, což umožní dělení látek z mobilní fáze do hydrofilní vrstvy.

Primární mechanismus separace je dělení látek založené na tvorbě vodíkových vazeb. Sekundárním mechanismem je elektrostatická interakce s nabitou stacionární fází, což ovlivňuje selektivitu. Eluce je umožněna zvyšováním polarizace mobilní fáze, tedy zvyšováním obsahu vodné fáze. Stacionární fáze má polární charakter, obvykle obsahující hydroxyl-ethyl skupiny a diol nebo amino skupiny.

Výhodou metody HILIC je možnost využití velkého množství organického rozpouštědla, které umožňuje spojení HPLC s MS detekcí, která zajišťuje vysokou citlivost [22].

V literatuře bylo popsáno mnoho dalších analytických metod ke stanovení obsahu kyseliny askorbové v potravinách a biologických materiálech. Jsou to spektrofotometrie, fluorimetrie a celá řada nespektrofotometrických metod. Patří k nim titrace, chemiluminiscence, průtoková injekční analýza (FIA), kapilární zónová elektroforéza (CZE), plynová chromatografie (GC), jiné metody jsou založeny na elektrochemické detekci, např. potenciometrie, polarografie, coulometrie, voltametrie [22].

2.3.4.6 *Titrační metoda*

Činidlo 2,6-dichlorofenolindofenol (DCIP) se nejvíce využívá k přímé titraci kyseliny askorbové. Principem stanovení je oxidačně-redukční reakce kyseliny askorbové s DCIP. Modře zbarvený 2,6-dichlorofenolindofenol oxiduje kyselinu askorbovou na kyselinu dehydroaskorbovou a zároveň se redukuje na bezbarvou leukobázi. Reakce probíhá v kyselém prostředí. Tato metoda není použitelná pro mnoho farmaceutických přípravků obsahujících např. Fe (II), Sn (II), Cu (I), SO₂, SO₃²⁻ a S₂O₃²⁻ ionty vázající se k minerálům, také látky přirozeně se vyskytující v ovoci nebo biologickém materiálu, jako jsou třísloviny, sulfhydrylové sloučeniny, které jsou oxidovány titračním barvivem. Alkalické vzorky rovněž stěžují stanovení. Metoda je použitelná pouze v případě, že koncentrace kyseliny dehydroaskorbové je zanedbatelná, vzorky neobsahují další redukční činidla a také neobsahují přírodní nebo přídavné barviva, která by mohla ztěžovat určení bodu ekvivalence reakce.

K dalšímu používanému titračnímu činidlu patří tetrachlorobenzochinon. Titrace se provádí v přítomnosti EDTA, která působí i jako chelatační činidlo. Bod ekvivalence je detekován zlatožlutým zbarvením roztoku. Další titrační činidla, která lze použít ke stanovení kyseliny askorbové jsou např. dihydroxyindol, jód nebo brom [23].

2.3.4.7 Elektrochemické metody

Polarografická analýza používá ke stanovení vitamínu C rtuťovou kapkovou elektrodu, na které dochází k oxidaci AA a redukci oxalinového derivátu, který vzniká kondenzací kyseliny DHA s o-fenylendiaminem. Polarografické stanovení kyseliny askorbové je specifické a lze je využít ve všech potravinářských materiálech, v praxi se však téměř nevyužívá.

Voltametrická analýza pomocí různých elektrod (konvenční, mikrodisky, uhlíkové pastové elektrody atd.) také není příliš vhodná pro stanovení vitamínu C. Hlavní nevýhodou je znečišťování elektrod produkty oxidace, což vede ke snížení spolehlivosti s opakovaným používáním.

Potenciometrické titrace byly použity ke stanovení askorbové kyseliny s využitím např. 2,6-dichloroindofenolem (DCIP), síranu měďnatého, jodu, tetrachlorobenzochinonu jako titračních činidel. Potenciometrické titrace jsou založeny na měření závislosti potenciálu vhodné indikační elektrody a objemu titračního činidla přidávaného do titrovaného roztoku. Výhodou této metody je možnost stanovení vitamínu C v silně barevných vzorcích, nevýhodou je však znečištění elektrod např. proteiny nebo jinými organickými látkami.

Coulometrické stanovení vitamínu C je založeno na kvantitativní oxidaci kyseliny askorbové na platinové anodě [23].

2.3.4.8 Fluorimetrické metody

Tyto metody jsou podmíněny tvorbou fluorescenčního produktu, který vzniká např. po oxidaci AA reakcí dehydroaskorbové kyseliny s o-fenylendiaminem, nebo po kondenzaci askorbové kyseliny s 2-kyanoacetamidem. Dále jsou to nepřímé fluorimetrické metody, které jsou založeny na redukci Ce^{4+} za vzniku Ce^{3+} , který emituje charakteristickou fluorescenci. Při fluorimetrickém stanovení vitamínu C je velmi důležité sledovat hodnotu pH, neboť intenzita fluorescence většiny látek je výrazně závislá právě na pH analyzovaných roztoků [24].

2.3.4.9 Fotometrické metody

K přímému stanovení celkového obsahu vitamínu C se používá např. metoda s 2,4-dinitrofenylhydrazinem (DNPH). Metoda zahrnuje reakci barviva DNPH s kyselinou dehydroaskorbovou za vzniku kondenzované kyseliny dehydroaskorbové (tzv. osazón), která je následně spektrofotometricky detekována při vlnové délce 520 nm. Touto metodou je možné stanovit i kyselinu askorbovou, po její oxidaci na kyselinu dehydroaskorbovou, např. 2,6-dichlorfenolindofenolem. Výsledné množství kyseliny askorbové se zjistí z rozdílu absorbcí vzorku před a po oxidaci [25].

2.4 Celková antioxidační kapacita

V posledních letech se zvyšuje množství poznatků a úroveň znalostí o úloze volných radikálů při oxidačním stresu u živých organismů. Velká pozornost se věnuje negativnímu působení těchto radikálů na organismus při řadě onemocnění.

Jedná se o reaktivní volné kyslíkové a dusíkové radikály, které jsou v organismu součástí mnoha biologických pochodů (např. se účastní v protizánětlivých reakcích, v procesu fagocytózy). Působí však i na biologicky významné sloučeniny, především lipidy, bílkoviny a nukleové kyseliny, přičemž mění jejich strukturu a tím i jejich funkci.

Pokud je tělo nedokáže svými přirozenými mechanismy likvidovat, kaskáda reakcí iniciovaná radikály vede k následným změnám ve struktuře buněk, k poškození celých tkání, orgánů a důležitých funkcí v organismu. Takové poškození v důsledku působení volných radikálů se považuje za patologickou příčinu kardiovaskulárních chorob, nádorového bujení, cukrovky, neurodegenerativních nemocí, narušení a selhání imunitního systému i procesů stárnutí.

Prevenčí organismu před vlivem exogenních i endogenních volných radikálů, je působení antioxidantů [16, 26].

2.4.1 Antioxidanty

Antioxidanty jsou molekuly, které jsou-li přítomny v malých koncentracích ve srovnání s látkami, které by měly chránit, mohou zabráňovat nebo omezovat oxidační destrukci těchto látek. K endogenním nízkomolekulárním antioxidantům patří např. glutathion, kyselina močová, koenzym Q a další. Mezi antioxidanty přírodního původu, které se do lidského organismu dostávají společně s potravou, se řadí vitaminy C, E a karotenoidy. Významné jsou i polyfenolické sloučeniny, jako flavonoidy, katechiny a fenolické kyseliny.

Zdrojem přírodních antioxidantů jsou některé potraviny rostlinného původu, jako jsou zelenina, ovoce, vláknina, čaje, vína, aromatické a léčivé rostliny. Nejvíce antioxidantů obsahují byliny, koření a ořechy. Vysoký obsah antioxidantů v koření a bylinách poskytuje dostatečné dávky i při jejich konzumaci v malém množství. Zajímavé je, že poměrně vysoký obsah těchto látek poskytuje káva ve formě espressa. Velmi účinné antioxidační enzymy jsou obsaženy v křenu a ředkvičkách [16, 26].

Tabulka 5: Ukázky obsahu antioxidantů v některých přírodních zdrojích [16, 27]

Zdroj	Antioxidanty (mmol · 100 g ⁻¹)
hřebíček	175-465
máta sušená	72-161
skořice mletá	18-140
káva filtrovaná	1-4
espresso	13-16
čaj	0,6-2,6
červené víno	1,8-3,7
hroznové víno	0,13-2,42
banán	0,08-0,34
černý rybíz	5,5-9,1
červený rybíz	1,6-1,9
jablka	0,1-0,5
pomeranče	0,8-1,1

Celkový denní příjem polyfenolů z různých zdrojů byl odhadnut na 1 g a je tedy vyšší, než příjem antioxidačních vitaminů. V řadě experimentálních studií bylo také prokázáno, že antioxidační aktivita mnoha rostlinných fenolických látek je vyšší, než účinek antioxidačních vitaminů A, C a E [26].

Tabulka 6: Doporučená denní dávka (DDD) vitaminů [20]

Antioxidační vitamin	DDD vitaminů (mg)
Vitamin A	800
Vitamin C	80
Vitamin E	12

Současná věda prokazuje, že volné kyslíkové a dusíkové radikály jsou příčinou mnoha onemocnění. Z těchto důvodů stoupá zájem stanovit antioxidační aktivitu různých látek rostlinného původu [16, 26].

2.4.2 Metody stanovení antioxidační kapacity

Jednou z možností výzkumů přírodních antioxidantů je testování reaktivity individuálních izolovaných látek vůči jednotlivým volným radikálům. Tento přístup slouží spíše k odvození vztahů mezi strukturou a reaktivitou příslušných sloučenin. Většinu antioxidantů člověk přijímá ve formě potravy, tedy jako součást složitých směsí. Složky směsí na sebe mohou vzájemně působit (synergicky i inhibičně) nebo mohou reagovat různými mechanismy s různými radikály. Proto je nutné charakterizovat antioxidační aktivitu směsných vzorků (rostlinných extraktů, potravin) i jako celku.

Pro vzájemné porovnání antioxidačních účinků různých směsí potravinových vzorků byl zaveden pojem celková antioxidační aktivita (total antioxidant activity – TAA). TAA je parametrem, který kvantifikuje kapacitu vzorku biologického materiálu eliminovat radikály. Ke stanovení TAA se nejčastěji používají metody TEAC, FRAP a ORAC. Celková antioxidační kapacita je pojem používaný v mnoha publikacích v širším významu a k jejímu stanovení se používá značná řada metod.

Zjištěná antioxidační aktivita *in vitro* nemusí odpovídat antioxidačnímu účinku *in vivo*, neboť dochází během trávení rostlinného materiálu a dalších metabolických procesů ke změnám přijímaného materiálu a jeho účinek v organismu může být ovlivněn.

K základním metodám stanovení antioxidační aktivity patří přímé reakce s radikály (zhášení, vylučování) nebo reakce s přechodnými kovy. Postupy ke stanovení míry antioxidačního působení látek jsou založeny na dvou různých principech. Jedná se o metody hodnotící schopnost eliminovat radikály a dále metody posuzující redoxní vlastnosti látek [26].

2.4.2.1 Metody založené na eliminaci radikálů

Tyto metody hodnotí schopnost vzorku vylučovat volné radikály, které mohou být do reakční směsi generovány, nebo je lze do reakční směsi přidat. Jde o kyslíkové radikály (hydroxyl, peroxy, superoxidový anion-radikál) nebo syntetické stabilní radikály (DPPH, ABTS⁺, galvinoxyl). Zvláštní skupinu tvoří metody testující schopnost inhibovat, nebo zpomalovat lipidovou peroxidaci [26].

A. Metody hodnotící eliminaci syntetických radikálů

- Metoda TEAC (používající ABTS)

Jednou ze základních a nejpoužívanějších metod pro stanovení celkové antioxidační aktivity je metoda využívající ABTS^{•+} (2,2-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)). Testuje schopnost vzorku nebo látky zhaset tento kationtový radikál. Relativně stabilní barevná forma radikálu se po redukci odbarvuje, přičemž rychlost a míra odbarvení jsou úměrné antioxidační aktivitě vzorku.

Metoda je označována také jako TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) z důvodu srovnání antiradikálových aktivit vzorku a syntetické látky Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2- karboxylová kyselina). Zhášení radikálu antioxidanty (donory vodíku) je sledováno spektrofotometricky na základě změn absorpčního spektra ABTS^{•+}. Nejčastěji je absorbance měřena při vlnové délce 734 nm. Celková antioxidační aktivita se hodnotí parametrem TEAC a označuje antioxidační kapacitu vzorku ekvivalentní definovanému množství syntetického derivátu Troloxu. Metoda stanovení TAA vzorků pomocí ABTS je jednoduchá, rychlá v provedení a má široké uplatnění. Lze ji použít na hodnocení látek různého původu až po směsné vzorky [26, 27].

- Metoda používající DPPH

Jde o základní metodu, podobnou metodě s ABTS, používanou pro posouzení antiradikálové aktivity čistých látek i různých směsných vzorků. Zakládá se na reakci testované látky s radikálem DPPH (difenylpikrylhydrazylem). Při reakci dochází k redukci radikálu za vzniku DPPH-H. Reakce je nejčastěji sledována spektrofotometricky. Pokles absorbance při 517 nm se měří buď po uplynutí určitého konstantního času, nebo se pracuje v kinetickém režimu. Metoda se moc nepoužívá ke stanovení barevných vzorků, neboť barva vzorku může interferovat. U směsných vzorků se radikálová aktivita někdy vyjadřuje v ekvivalentech kyseliny askorbové nebo v jednotkách standardu Troloxu.

Mezi metody využívající reakci antioxidantu se stabilním radikálem se řadí také test s galvinoxylem. Princip metody je stejný jako u metody s DPPH s jediným rozdílem, že se reakce sleduje spektrofotometricky při vlnové délce 428 nm. Lze použít také syntetický volný radikál Fremyho sůl (nitrosodisulfonan draselný), detekce a hodnocení reakce se provádí pomocí EPR (electronová paramagnetická resonance) [26].

B. Metody hodnotící eliminaci kyslíkových radikálů

- Metoda ORAC

ORAC (oxygen radical absorbance capacity) metoda hodnotí schopnost testované látky zpomalit nebo zastavit radikálovou reakci. V systému se generují kyslíkové radikály a princip metody spočívá v tvorbě β -fykoerytrinu. Detekce je založena na vychytávání radikálů látkami, jejichž reakční produkty lze snadno stanovit. Antioxidanty vychytávají kyslíkové radikály a tím snižují tvorbu β -fykoerytrinu. Úbytek fluorescence β -fykoerytrinu je detekován fluorimetricky po ataku radikály.

Pro generaci peroxylových radikálů se používá AAPH (2,2-azobis(isobutyrimidamid)-dihydrochlorid), při generaci hydroxylových radikálů pak systém $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cu}^{2+}$. Kyslíkové, hydroxylové a peroxylové radikály patří k nejreaktivnějším radikálům, proto se metoda ORAC řadí k důležitým parametrům charakterizujícím antioxidační kapacitu vzorků různého typu. Lze zavést i jiné fluorescenční sondy a to např. fluorescein, metoda se poté zpřesňuje a uvádí se, že metoda ORAC_{FL} je exaktnější v důsledku přesného a jednoduchého reakčního mechanismu, který spočívá v klasickém přenosu vodíku [26, 27].

C. Metody hodnotící eliminaci lipidové peroxidace

Bylo vyvinuto mnoho metod hodnotících vliv antioxidantů na lipidovou peroxidaci, od nejjednodušších, které jsou prováděny s jednoduchými lipidy a v jednoduchých fázových systémech, až po složitější biologické modely simulující situaci *in vivo* a využívající biologické membrány jako matrici.

Látky potlačující lipidovou peroxidaci mohou eliminovat jak iniciační kyslíkové radikály (OH \cdot), tak sekundárně vznikající radikálové meziprodukty (peroxyl, alkoxy) a mohou též působit jako látky chelatující ionty přechodných kovů.

K nejjednodušším testům patří metody založené na detekci produktů peroxidace linolové kyseliny. Jako iniciátor radikálové reakce je často užíván AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropan), produkty peroxidace jsou sledovány spektrofotometricky při 234 nm. Metoda je prováděna v řadě modifikací lišících se přípravou lipidové fáze a způsobem detekce.

Jednou z nejužívanějších metod je TBA-MDA. Metoda je založena na stanovení jednoho ze sekundárních produktů lipidové peroxidace malondialdehydu (MDA) na základě jeho barevné reakce s kyselinou thiobarbiturovou (TBA). Absorbance se měří při 532 nm. Spektrofotometrické stanovení aduktů TBA-MDA je jednoduché a citlivé, avšak nespecifické, neboť zahrnuje stanovení všech látek reagujících s TBA. Ke specifitějšímu vyhodnocení kvantity aduktů TBA-MDA může být použita metoda HPLC [26, 27].

2.4.2.2 Metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek

Neenzymové antioxidanty lze charakterizovat jako redukční činidla, která reagují s oxidanty, redukuje je a tím je inaktivují. Z tohoto pohledu lze antioxidační aktivitu posuzovat na základě redukční schopnosti látky [26].

A. Metody chemické

- Metoda FRAP

Při metodě FRAP (ferric reducing antioxidant potential) antioxidanty ve vzorku redukuje železité komplexy např. Fe^{3+} -2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazin) (Fe^{3+} -TPTZ). Nárůst absorbance při 593 nm odpovídající množství komplexu Fe^{2+} -TPTZ je mírou antioxidační aktivity vzorku [26, 27].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Odrůdy bílého rybízu (*Ribes glandulosum*) Blanka, Jantar, Orion, Primus a Viktorie pocházejí z Želešic. Neznámá odrůda bílého rybízu pochází z oblasti střední Moravy. Odrůdy červeného rybízu (*Ribes rubrum*) Detvan, Rovada, Rubigo a Tatran pocházejí také z Želešic, další odrůdy Detvan, Holandský červený, Losan, Rubigo a Vitan pocházejí z Lysic (Zeas a.s. Lysice). Z Padochova pochází pouze odrůda Detvan. Neznámá odrůda 1 černého rybízu (*Ribes nigrum*) pochází z oblasti jižní Moravy, neznámá odrůda 2 pochází z oblasti Vysočiny.

Všech patnáct známých odrůd bylo sesbíráno v průběhu měsíce července roku 2012. Vzorky byly uchovávány v chladicím boxu při teplotě -18 °C, do doby analýzy. Všechna měření byla prováděna vždy ihned po přípravě šťávy z plodů rybízů. Neznámé vzorky černého rybízu byly analyzovány k porovnání vybraných nutričních parametrů s červenými a bílými rybízy.

3.1 Stanovení anthokyanů v plodech rybízu pH diferenciální metodou

3.1.1 Použité pomůcky, přístroje a chemikálie

Pomůcky

- běžné laboratorní sklo
- gáza
- automatická pipeta 200 µl, 1000 µl (Biohit, Finsko)
- květy

Přístroje

- lednička s mrazničkou (Amica AD 250, Česká republika)
- analytické váhy (Helago, Česká republika)
- kuchyňský mixér (Bosch, Německo)
- pH metr MPH 372 (Monokrystaly, Česká republika)
- laboratorní centrifuga
- UV/VIS spektrofotometr Helios γ (Spectronic Unicam, USA)

Chemikálie

- chlorid draselný p.a. (Lachema, Česká republika)
- sodná sůl kyseliny ethanové p.a. (Lachema, Česká republika)
- disiřičitan draselný (Lachema, Česká republika)
- kyselina chlorovodíková (Lach-ner, Česká republika)

3.1.2 Příprava roztoků

- Příprava 0,025 M pufru chloridu draselného o pH 1,0

Na analytických vahách bylo naváženo přibližně 0,465 g chloridu draselného. Navážka byla kvantitativně převedena do kádinky a rozpuštěna ve 180 ml destilované vody. Pomocí pH metru bylo měřeno pH roztoku, které bylo upraveno koncentrovanou kyselinou

chlorovodíkovou na požadované pH 1,0. Roztok byl poté převeden do odměrné baňky o objemu 250 ml a byl doplněn destilovanou vodou po rysku.

- Příprava 0,4 M pufru ethanoátu sodného o pH 4,5

Na analytických vahách bylo naváženo přibližně 13,607 g pevného octanu sodného. Navážka byla kvantitativně převedena do kádinky a rozpuštěna ve 180 ml destilované vody. Pomocí pH metru bylo měřeno pH roztoku, které bylo upraveno koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou na požadované pH 4,5. Roztok byl poté převeden do odměrné baňky o objemu 250 ml a byl doplněn destilovanou vodou po rysku.

- Příprava roztoku disiřičitanu draselného

Na analytických vahách byl odvážen 1,0 g disiřičitanu draselného. Navážka byla kvantitativně převedena do zkumavky a rozpuštěna v 5 ml destilované vody.

3.1.3 Příprava šťávy z plodů červeného a černého rybízu

Na analytických vahách bylo naváženo přibližně 10 g zmražených plodů různých odrůd červeného a černého rybízu. Navážka plodů byla vždy zhomogenizována kuchyňským mixérem a vyloučená šťáva byla přefiltrována přes gázu do kádinky. Filtrát byl odstředěn na laboratorní centrifuze.

3.1.4 Příprava vzorků

Odstředěná šťáva z černého a červeného rybízu byla ředěna pufrům chloridu draselného na celkový objem 3 ml. Postupným proměřením absorbance vzorku při maximální vlnové délce 510 nm byl stanoven vhodný faktor ředění. Objem šťávy vzorku byl u černého rybízu stanoven na 25 μ l a u červeného rybízu na 1 ml.

Jedna sada vzorků obsahovala vždy čtyři zředěné vzorky. Jeden s pufrům chloridu draselného, druhý s pufrům octanu sodného a zbylé dva vzorky byly naředěny destilovanou vodou. Každý vzorek byl doplněn na celkový objem 3 ml. U vzorků ředěných destilovanou vodou bylo odebráno 200 μ l a k jednomu z nich bylo napipetováno 200 μ l destilované vody, k druhému bylo napipetováno 200 μ l činidla disiřičitanu draselného.

3.1.5 Měření absorpčního spektra anthokyanů při různém pH

Změřením absorpčního spektra anthokyanů při pH pufrů 1,0 a 4,5 byl ověřen rozsah vlnových délek v UV/VIS oblasti, při kterých hodnota absorbance měřených vzorků u červeného a černého rybízu dosáhla maximálních hodnot. K měření absorpčního spektra byly připraveny vzorky ředěné pufrům chloridu draselného a octanu sodného stejným způsobem jako v kapitole 3.1.4. Pomocí UV/VIS spektrofotometru Helios bylo proměřeno absorpční spektrum připravených vzorků v rozmezí vlnových délek 350 - 720 nm.

3.1.6 Měření absorbance vzorků

Pomocí UV/VIS spektrofotometru Helios byly měřeny absorbance připravených vzorků při vlnových délkách 510 nm a 700 nm. Při vlnové délce 420 nm byly měřeny pouze vzorky ředěné vodou. Jako srovnávací roztok byla použita destilovaná voda. Každá odrůda byla proměřena třikrát.

3.1.7 Stanovení celkového zastoupení anthokyanových barviv v plodech rybízu

Z naměřených hodnot absorbancí vzorků černého i červeného rybízu byla vypočtena koncentrace monomerního pigmentu kyanidin 3-glukosidu v plodech rybízu. Výsledné hodnoty koncentrací vzorků v $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ byly přepočteny na navážku původního vzorku a vyjádřeny v mg na 100 g plodů, pomocí následujících vztahů:

- absorbance ředěných vzorků

$$A = (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}1,0} - (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}4,5}, \quad (1)$$

kde A je absorbance vzorku při dané vlnové délce a pH roztoku.

- koncentrace monomerního pigmentu v původním vzorku

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

kde c_{MP} je výsledná koncentrace monomerního pigmentu ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$), A je absorbance zředěného vzorku, M je molekulová hmotnost pigmentu kyanidin 3-glukosid, F je faktor ředění, ε je molární absorpční koeficient pro kyanidin 3-glukosid ($\text{l} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), konstanta pro danou látku za daných podmínek při určité vlnové délce, l je tloušťka absorbující vrstvy (cm), většinou tloušťka květy.

- přepočet koncentrace monomerního pigmentu ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$) na 100 g plodů ($\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$)

$$c = \frac{x \cdot V \cdot 0,1}{m}, \quad (3)$$

kde c je celkový obsah monomerního anthokyanu ve 100 g plodů ($\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$), x je koncentrace monomerního pigmentu ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$), vypočtená dle vztahu (2), V je objem šťávy (ml) získané z m hmotnosti navážky plodů pro daný vzorek (g).

Z naměřených hodnot absorbancí vzorků černého i červeného rybízu bylo dále vypočteno procentuální zastoupení polymerní barvy pigmentů ve vzorcích, pomocí následujících vztahů:

- sytost barvy kontrolního vzorku

$$\text{Sytost barvy} = \left[(A_{420\text{nm}} - A_{700\text{nm}}) + (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}}) \right] \cdot F, \quad (4)$$

kde sytost barvy je intenzita barvy vzorku ředěného pouze destilovanou vodou, F je faktor ředění.

- polymerní barva vzorku s činidlem disiřičitanu draselného

$$\text{Polymerní barva} = [(A_{420\text{nm}} - A_{700\text{nm}}) + (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})] \cdot F, \quad (5)$$

kde polymerní barva je intenzita barvy vzorku s přidavkem bělicího činidla disiřičitanu draselného, F je faktor ředění.

- procentuální zastoupení polymerní barvy pigmentu

$$\% = \frac{\text{polymerní barva}}{\text{sytostbarvy}} \cdot 100 \quad (6)$$

3.2 Stanovení anthokyanů v plodech rybízu metodou HPLC

3.2.1 Použité pomůcky, přístroje a chemikálie

Pomůcky

- běžné laboratorní sklo
- vývěva
- injekční stříkačky, 2 ml (Chirana Injecta, Slovenská republika)
- mikrostříkačka, 25 μ l (Hamilton, USA)
- celulózové mikrofiltry 0,45 μ m (Chromservis, Česká republika)
- filtrační papír č. 0 (Papírny Perštejn, Česká republika)
- mikropipeta (Biohit, Finsko)
- vialky, vršky, septa (Chromservis, Česká republika)
- kolona Synergi 4 ml C12 Max-RP, 250 \times 4,6 mm (Phenomenex, USA)

Přístroje

- ultrazvuková lázeň (Kraintek, Slovenská republika)
- lednička s mrazničkou (Amica AD 250, Česká republika)
- kuchyňský mixér (Bosch, Německo)
- přístroj na přípravu demineralizované vody (Watrex, Česká republika)
- analytické váhy (Helago, Česká republika)
- pH metr MPH 372 (Monokrystal s.r.o., Turnov, Česká republika)
- HPLC system (Spectra SYSTEM, USA)
 - gradientová pumpa P 4000
 - autosampler AS 3000
 - spektrofotometrický detektor UV 6000 LP
 - počítač, HPLC systém obsluhován pomocí softwaru ChromQuest 4.0

Chemikálie

- redestilovaná voda (FCH VUT Brno, Česká republika)
- acetonitril CHROMASOLV, HPLC grade (Sigma aldrich, Stenheim, Německo)
- kyselina mravenčí, 98% p.a. (Lach-ner s.r.o., Neratovice, Česká republika)

3.2.2 Příprava roztoků

- Roztok mobilní fáze A – redestilovaná voda : acetonitril (83 : 3)
- Roztok mobilní fáze B – redestilovaná voda : acetonitril (40 : 60)

Mobilní fáze A a B byly připraveny smícháním redestilované vody s acetonitrilem vždy v daném poměru na konečný objem 900 ml. Následně bylo upraveno pH těchto mobilních fází kyselinou mravenčí na hodnotu 1,8 (z důvodu stability anthokyanových barviv). Takto připravené mobilní fáze byly odplyněny v ultrazvukové lázni po dobu 15 minut.

- Příprava vzorku na analýzu

Z každé odrůdy rybízu byl na analytických vahách odvážen vzorek o hmotnosti přibližně 10 g. Navážka byla zalita kolem 15 ml redestilované vody. Poté byl vzorek zhomogenizován kuchyňským mixérem a byl kvantitativně převeden do 25ml odměrné baňky a doplněn redestilovanou vodou po rysku. Po promíchání byl vzorek zfiltrován přes řídký filtr. Filtrát byl přes 0,45 μm celulózový filtr nasán do stříkačky a nastříknut do 1ml vialky. Vialka se vzorkem byla odplyněna v ultrazvukové lázni po dobu 15 minut a uzavřena víčkem s pryžovým septem, poté byla umístěna do autosampleru. Připravený vzorek byl vždy ihned analyzován.

3.2.3 HPLC analýza

Separace anthokyanových barviv proběhla na koloně Synergi C12 Max-RP o rozměru $250 \times 4,6$ mm s průměrem částic 4 μm . Ke gradientové eluci byly použity dva zásobní roztoky mobilních fází. Mobilní fáze A (redestilovaná voda : acetonitril v poměru 83 : 3) a mobilní fáze B (redestilovaná voda : acetonitril v poměru 40 : 60). Profil gradientové eluce je uveden v Tabulce 11. Průtok mobilní fáze byl nastaven na $0,8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Velikost nástřiku byla vždy 20 μl . Analýza vzorků rybízu červeného proběhla při teplotě 40 $^{\circ}\text{C}$ a analýza vzorků rybízu černého při teplotě 30 $^{\circ}\text{C}$. Detektor s diodovým polem zaznamenával spektrum v rozmezí vlnových délek 200–600 nm. Analyty byly sledovány při vlnové délce 520 nm.

Vybrané mobilní fáze a jejich poměry byly zvoleny na základě literatury, která byla dodána spolu s kolonou Synergi C12 Max-RP.

Stanovení anthokyanů bylo provedeno na kapalinovém chromatografu HPLC Spectra SYSTEM z USA (Obrázek 12).



Obrázek 12: Chromatograf HPLC Spectra SYSTEM

3.3 Stanovení vitamínu C v plodech rybízu metodou HPLC

3.3.1 Použité pomůcky, přístroje a chemikálie

Pomůcky

- běžné laboratorní sklo
- vývěva
- injekční stříkačky, 2 ml (Chirana Injecta, Slovenská republika)
- celulózové mikrofiltry 0,45 μm (Chromservis, Česká republika)
- filtrační papír č. 0 (Papírny Perštejn, Česká republika)
- mikropipeta (Biohit, Finsko)

Přístroje

- lednička s mrazničkou (Amica AD 250, Česká republika)
- ultrazvuková lázeň (Kraintek, Slovenská republika)
- kuchyňský mixér (Bosch, Německo)
- přístroj na přípravu demineralizované vody (Watrex, Česká republika)
- analytické váhy (Helago, Česká republika)
- HPLC přístroj (Waters, USA)
 - pumpa: Waters 1515 Isocratic HPLC Pump
 - UV detektor: Waters 2487 Dual Absorbance Detector
 - počítač DELL, HPLC systém obsluhován pomocí softwaru Breeze

Chemikálie

- redestilovaná voda
- kyselina L-askorbová (Riedel-de Haen, Německo)
- kyselina monohydrogenfosforečná (Fluka, Německo)
- dihydrogenfosforečnan draselný (Lachema a.s., Česká republika)
- methanol, HPLC-grade (Sharlau chemie a.s., Španělsko)
- kyselina šťavelová, dihydrát (Lach-ner, Česká republika)

3.3.2 Příprava roztoků

- Roztok mobilní fáze - dihydrogenfosforečnan draselný : methanol (9 : 1)

Navážka 13,6025 g KH_2PO_4 byla rozpuštěna v 900 ml redestilované vody. Poté bylo přidáno 100 ml methanolu a roztok byl odplyněn na ultrazvuku.

- Extrakční roztok kyseliny monohydrogenfosforečné

Nejprve bylo 30 g kyseliny monohydrogenfosforečné rozpuštěno ve 100 ml horké redestilované vody. Těchto 100 ml bylo poté naředěno v poměru 1 : 4 redestilovanou vodou na celkový objem 500 ml. Připravený 2% roztok kyseliny monohydrogenfosforečné byl uchováván v lednici.

- Standardní roztok kyseliny askorbové

Navážka 0,0250 g kyseliny askorbové byla rozpuštěna v 25 ml 2% roztoku kyseliny monohydrogenfosforečné. Roztok byl uchováván v lednici.

- Kalibrační křivka

Ze zásobního standardního roztoku o koncentraci $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ kyseliny askorbové rozpuštěné v 2% roztoku kyseliny monohydrogenfosforečné byly připraveny standardní roztoky kalibrační křivky o koncentraci 1, 10, 20, a $40 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ zředěním zásobního roztoku roztokem 2% kyseliny monohydrogenfosforečné. Každá koncentrace byla připravována ze zásobního roztoku vždy bezprostředně před nástřikem. Zásobní roztok byl mezi měřeními jednotlivých koncentrací skladován v ledničce.

- Příprava vzorku na analýzu

Z každé odrůdy rybízu byly na analytických vahách odváženy tři vzorky o hmotnosti kolem 4 g. Navážka byla zalita extrakčním činidlem (přibližně 15 ml). Poté byl vzorek zhomogenizován kuchyňským mixérem a byl kvantitativně převeden do 25ml odměrné baňky a doplněn rozpouštědlem po rysku. Po promíchání byl vzorek zfiltrován přes řídký filtr. Filtrát z plodů červených rybízů byl vždy 1krát ředěn a filtrát z plodů černých rybízů byl ředěn 10krát. Poté byl naředěný vzorek přes $0,45 \mu\text{m}$ celulósový filtr nasán do stříkačky a nastříknut 3krát do chromatografu.

3.3.3 HPLC analýza

Separace vitamínu C proběhla na koloně Gemini C18 o rozměru $150 \times 4,6 \text{ mm}$ s průměrem částic $5 \mu\text{m}$. Jako mobilní fáze byl použit fosfátový pufr s methanolem. Extrakčním činidlem byla 2% kyseliny monohydrogenfosforečná. Průtok mobilní fáze byl nastaven na $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Velikost nástřiku byla $10 \mu\text{l}$. Během všech analýz byl termostat nastaven na teplotu $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Analyt byl sledován při vlnové délce 254 nm .

Stanovení vitamínu C bylo provedeno na kapalinovém chromatografu HPLC Waters, USA (Obrázek 13).



Obrázek 13: Chromatograf HPLC Waters

3.3.4 Stanovení celkového množství vitamínu C v plodech rybízu

Kyselina askorbová byla identifikována porovnáním retenčních časů píků na chromatogramech roztoků kalibrační křivky. Plocha píku kyseliny askorbové byla stejně jako v případě roztoků kalibrační křivky získána integrací píku v systému Breeze. Ze tří nástríků byla vypočtena průměrná plocha píku a dle regresní rovnice kalibrační křivky byla stanovena průměrná koncentrace kyseliny askorbové v daném extraktu ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$). Tato hodnota byla přepočtena na navážku původního vzorku a vyjádřena v mg na 100 g plodů dle vztahu:

$$c = \frac{x \cdot V \cdot F \cdot 0,1}{m}, \quad (7)$$

kde c je výsledná koncentrace vitamínu C přepočtená na 100 g plodů ($\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$), x je koncentrace vitamínu C odečtená z kalibrační křivky ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$), V je objem ve kterém byla rozpuštěna navážka vzorku (ml), F je faktor zředění, 0,1 je koeficient pro přepočet na 100 g plodů a m je hmotnost navážky plodů pro daný vzorek (g).

3.4 Stanovení antioxidační kapacity v plodech rybízu metodou DPPH

3.4.1 Použité pomůcky, přístroje a chemikálie

Pomůcky

- běžné laboratorní sklo
- vývěva
- filtrační papír č. 0 (Papírny Perštejn, Česká republika)
- automatická pipeta 200 μl , 1000 μl (Biohit, Finsko)
- kyveta

Přístroje

- lednička s mrazničkou (Amica AD 250, Česká republika)
- analytické váhy (Helago, Česká republika)
- kuchyňský mixér (Bosch, Německo)
- UV/VIS spektrofotometr Helios γ (Spectronic Unicam, USA)

Chemikálie

- 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (Sigma-Aldrich, Německo)
- methanol (pro HPLC, Sigma-Aldrich, USA)

3.4.2 Příprava roztoků

- Příprava standardního roztoku volného radikálu DPPH o koncentraci $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$

Navážka 1,9 mg volného radikálu DPPH byla rozpuštěna v methanolu, kvantitativně převedena do 50ml odměrné baňky a doplněna methanolem po značku.

- Příprava vzorku

Z každé odrůdy rybízu bílého byl na analytických vahách odvážen vzorek o hmotnosti kolem 4 g. Navážka byla zalita methanolem (přibližně 25 ml). Poté byl vzorek zhomogenizován kuchyňským mixérem. Získaný extrakt byl zfiltrován přes řídký filtr a filtrát byl kvantitativně převeden do 50ml odměrné baňky a doplněn methanolem po rysku. Do květy bylo vždy pipetováno 100 μ l tohoto roztoku. Poté byl roztok 15krát ředěn methanolem na celkový objem 1,5 ml a k tomuto objemu bylo přidáno 1,5 ml roztoku radikálu DPPH.

3.4.3 Měření absorbance vzorků

Pomocí UV/VIS spektrofotometru Helios byla ihned po přidání roztoku radikálu DPPH k připraveným vzorkům měřena absorbance, po dobu 6 minut v časovém intervalu 10 s, při vlnové délce 517 nm. Jako srovnávací roztok byl použit methanol. Dále byla změřena absorbance směsi roztoku radikálu DPPH s methanolem (v poměru 1 : 1) nutná k výpočtu zhášecí aktivity.

3.4.4 Stanovení celkové antioxidační kapacity v plodech rybízu

Z naměřených hodnot absorbancí vzorků bílého rybízu byla sestrojena závislost poklesu absorbance na čase. Z této závislosti bylo vypočteno procento zhášecí aktivity analyzovaného vzorku, pomocí následujícího vztahu:

$$X = 100 - \left[\left(\frac{A_{\text{DPPH+MetOH}}}{A_{\text{DPPH+vzorek}}} \right) \cdot 100 \right], \quad (8)$$

kde $A_{\text{DPPH + MetOH}}$ je hodnota absorbance roztoku radikálu DPPH s methanolem v poměru 1 : 1, $A_{\text{DPPH + vzorek}}$ je hodnota absorbance vzorku s roztokem radikálu DPPH v určitém zvoleném časovém intervalu, X je procentuální hodnota zhášecí aktivity analyzovaného extraktu.

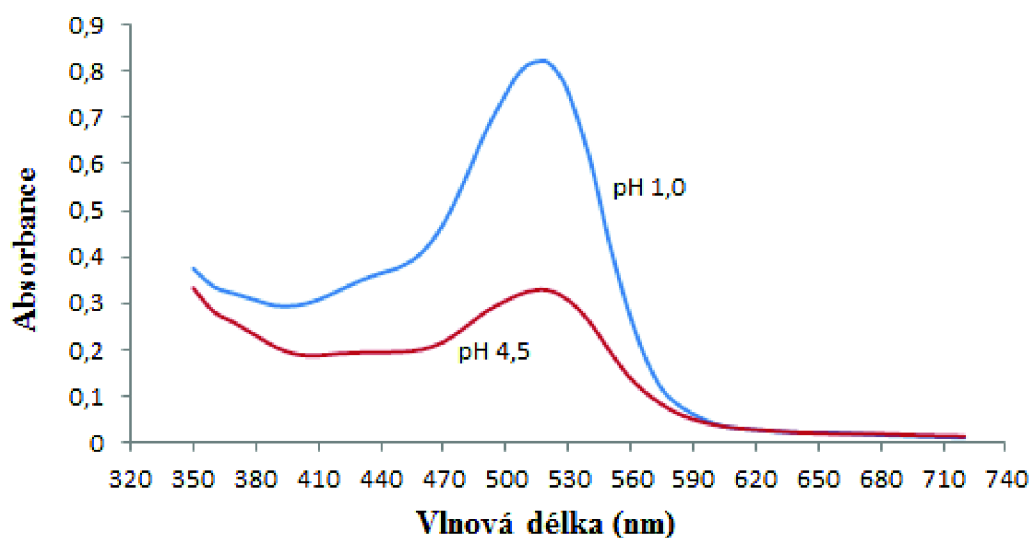
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Stanovení anthokyanů pH diferenciální metodou

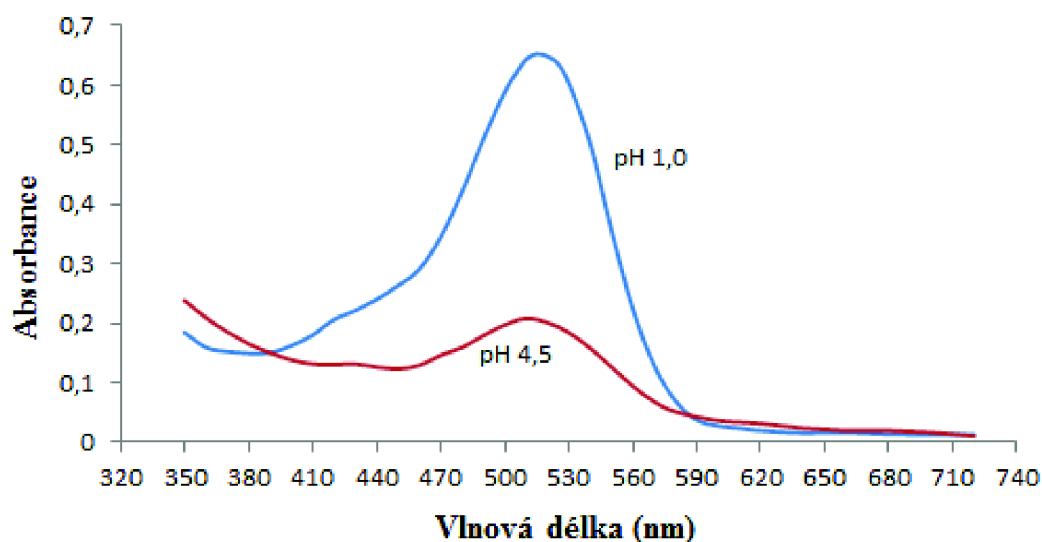
Stanovení anthokyanů v plodech vybraných odrůd černého a červeného rybízu bylo provedeno podle návodu uvedeného v *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* [6].

4.1.1 Absorpční spektra anthokyanů při pH 1 a pH 4,5

K ověření rozsahu vlnových délek v UV/VIS oblasti, při kterých hodnota absorbance měřeného vzorku dosáhne maximálních hodnot, byla změřena absorpční spektra anthokyanů při různých pH.



Obrázek 14: Absorpční spektrum anthokyanů v červeném rybízu



Obrázek 15: Absorpční spektrum anthokyanů v černém rybízu

Bylo proměřeno absorpční spektrum připraveného vzorku, podle postupu uvedeného v kapitole 3.1.5, v rozmezí vlnových délek 350–720 nm. Maximální hodnoty absorbancí vzorků byly zjištěny při vlnových délkách kolem 420 nm a 510 nm, což odpovídá hodnotám maximálních absorbancí pro anthokyany obsažené v rybízích.

4.1.2 Výsledné hodnoty množství anthokynů v plodech vybraných odrůd rybízu

Pro stanovení celkového obsahu monomerního pigmentu ($\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ plodů) a procentuálního zastoupení polymerní barvy pH diferenciální metodou byly vybrány následující odrůdy rybízů:

Tabulka 7: Vybrané odrůdy rybízů pro stanovení anthokyanů pH diferenciální metodou

Rybíz červený	Rybíz černý
Detvan Želešice	
Detvan Padochov	
Holandský červený	
Rubigo Želešice	Neznámý vzorek 1
Rubigo Lysice	Neznámý vzorek 2
Losan	
Tatran	
Vitan	

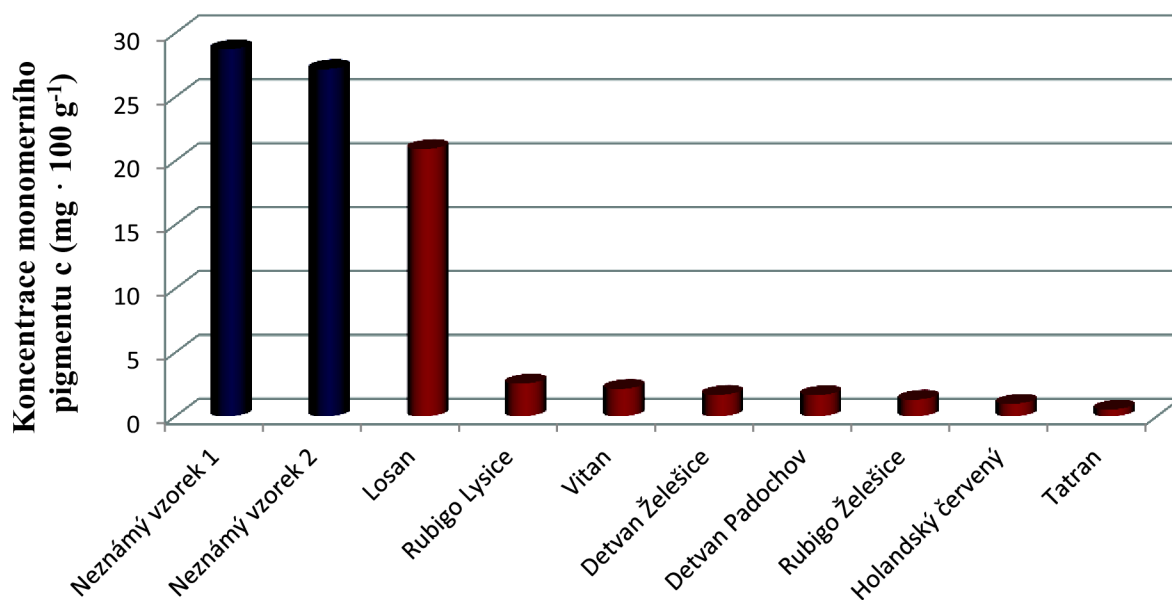
Stanovení celkového obsahu monomerního pigmentu ($\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) a procentuálního zastoupení polymerní barvy v plodech rybízů bylo provedeno spektrofotometricky. Postup stanovení je uveden v kapitole 3.1.7. Všechny vzorky byly změřeny třikrát a výsledky byly statisticky zpracovány pomocí programu Microsoft Office Excel 2010.

Hlavním nekondenzovaným anthokyanem je kyanidin 3-glukosid (60 - 88 %), následovaný kyanidin 3-rutinosidem (1 - 11 %) [33]. Proto byl ve vztahu pro výpočet koncentrace monomerního pigmentu ($\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) použit právě anthokyan kyanidin 3-glukosid.

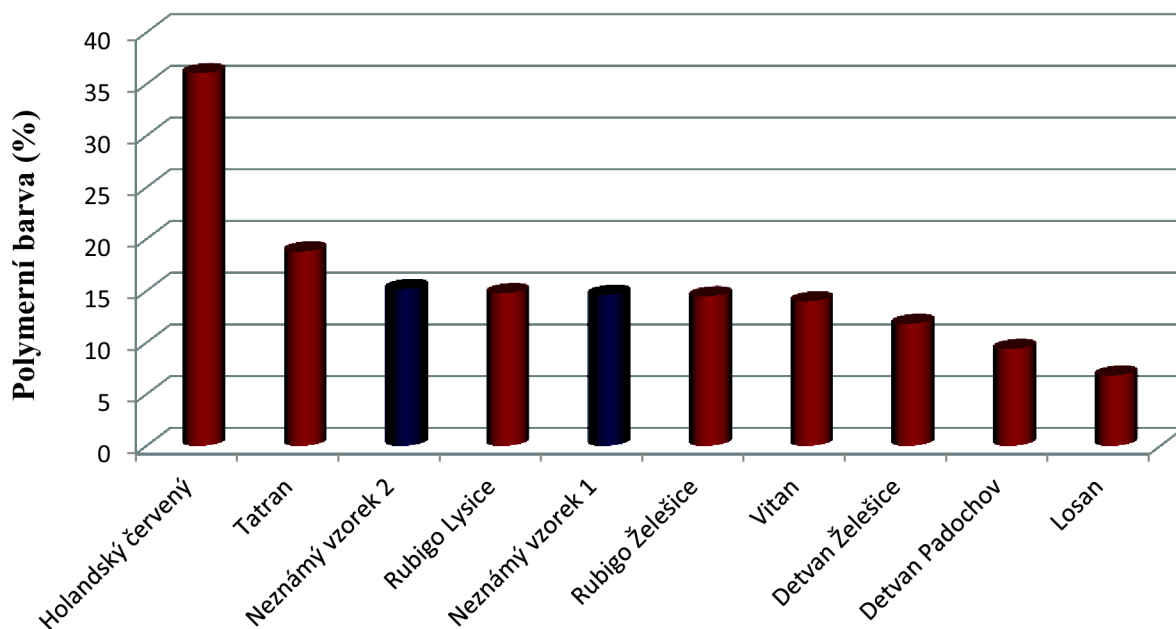
Tabulka 8: Vypočtené hodnoty celkového obsahu monomerního pigmentu jako ekvivalentu cy-3-glu a procentuální zastoupení polymerní barvy v plodech vybraných odrůd rybízu

Odrůda	Celkový obsah monomerního pigmentu c ($\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	Polymerní barva (%)
Detvan Želešice	$1,67 \pm 0,01$	$11,81 \pm 0,05$
Detvan Padochov	$1,65 \pm 0,02$	$9,38 \pm 0,23$
Holandský červený	$0,99 \pm 0,02$	$36,05 \pm 0,17$
Rubigo Želešice	$1,31 \pm 0,01$	$14,48 \pm 0,90$
Rubigo Lysice	$2,56 \pm 0,01$	$14,78 \pm 0,30$
Losan	$20,91 \pm 0,32$	$6,81 \pm 1,36$
Tatran	$0,53 \pm 0,001$	$18,81 \pm 0,14$
Vitan	$2,14 \pm 0,01$	$13,99 \pm 0,40$
Neznámý vzorek 1	$28,73 \pm 1,05$	$14,63 \pm 3,87$
Neznámý vzorek 2	$27,18 \pm 1,86$	$15,20 \pm 2,06$

Pro srovnání různých odrůd rybízu podle zastoupení stanoveného obsahu monomerního pigmentu v mg na 100 g čerstvých plodů a procentuálního zastoupení polymerní barvy, jsou na Obrázcích 16 a 17 uvedeny seřazené odrůdy červených a černých rybízů.



Obrázek 16: Celkový obsah monomerního pigmentu c (mg · 100 g⁻¹) ve vybraných odrůdách rybízu stanovený pH diferenciální metodou



Obrázek 17: Polymerní barva (%) ve vybraných odrůdách rybízu stanovená pH diferenciální metodou

Obsah anthokyanových pigmentů v ovocných nebo zeleninových šťávách se obvykle pohybuje v rozmezí od 50 do 500 mg · l⁻¹. Čerstvé ovocné nebo zeleninové šťávy by měly mít nízké procento polymerní barvy (obvykle méně než 10 %), přičemž u zpracovaných a uskladněných vzorků bude procentuální zastoupení polymerní barvy mnohem vyšší (30 % nebo více). Hodnota polymerní barvy je tedy velmi proměnlivá a liší se v závislosti na typu vzorku či výrobku, podmínkách zpracování a uskladnění [6].

Pro srovnání obsahu monomerního anthokyanu v jiných odrůdách rybízů, jsou v Tabulce 9 uvedeny publikované hodnoty obsahu monomerního pigmentu v mg na 100 g čerstvých plodů různých odrůd rybízů.

Tabulka 9: Publikované hodnoty stanovených obsahů monomerního pigmentu jako ekvivalentu kyanidin 3-glukosidu pH diferenciální metodou [2, 3]

Rybíz	Odrůda	Obsah monomerního pigmentu c (mg · 100 g⁻¹)
červený	Rovada	7,5
červený	London Market	7,8
bílý	White Versailles	1,4
černý	Ben Lomond	11,9

pH diferenciální metodou bylo stanoveno, že rybíz černý obsahuje přibližně o 85 % více monomerního pigmentu, než rybíz červený. U černých rybízů nejsou známy odrůdy, tyto plody však byly analyzovány pro srovnání s plody rybízu červeného. Obsah celkového monomerního pigmentu u dvou vzorků rybízů černých se pohyboval kolem hodnoty 28 mg na 100 g plodů. V případě procentuálního zastoupení polymerní barvy těchto dvou odrůd se hodnota lišila opět jen nepatrně, Neznámá odrůda 1 (14,63 %) a Neznámá odrůda 2 (15,20 %).

U plodů rybízu červeného byl nejvyšší obsah celkového monomerního pigmentu stanoven v odrůdě Losan 20,91 mg na 100 g plodů a nejnižší obsah v odrůdě Tatan 0,53 mg na 100 g plodů. Obsah celkového monomerního pigmentu u zbylých odrůd se pohyboval v rozmezí od 0,99–2,56 mg · 100 g⁻¹ plodů. Nejvyšší procentuální zastoupení polymerní barvy bylo stanoveno u odrůdy Holandský červený a to na hodnotu 36,05 %. Naopak nejnižší procentuální zastoupení polymerní barvy bylo stanoveno u odrůdy Losan 6,81 %, což koresponduje s obsahem monomerního pigmentu. U zbylých odrůd se procento polymerní barvy pohybovalo v rozmezí od 9,28 do 18,83 %.

4.2 Stanovení anthokyanů metodou HPLC

Analyzováno bylo dvanáct odrůd rybízu, dvě odrůdy rybízu černého a 10 odrůd rybízu červeného. Metoda stanovení byla nejprve optimalizována. Příprava vzorků rybízu pro analýzu je uvedena v kapitole 3.2.2. Analýza trvala 30 minut, pro rybíz černý, 40 min pro rybíz červený. Každý vzorek byl analyzován 3krát. Díky dostupné odborné literatuře mohla být jednotlivá anthokyanová barviva obsažená v plodech rybízů identifikována.

4.2.1 Optimalizace gradientu mobilní fáze

K optimalizaci gradientu mobilní fáze byl použit vzorek odrůdy Detvan Padochov pro analýzu červených rybízů a vzorek odrůdy Neznámý vzorek 1 pro analýzu černých rybízů. Celkem bylo vyzkoušeno přibližně deset různých profilů gradientů. Gradient, který byl dodán výrobcem kolony Synergi C12 Max-RP, slouží pro stanovení anthokyanů v červeném víně. Barviva obsažená v červeném víně se však liší od zastoupení jednotlivých anthokyanových barviv v rybízu, proto byl tento gradient nevhodný. U většiny použitých gradientů došlo k neúplnému rozdělení jednotlivých analytů, nebo nedošlo k separaci barviv vůbec. Nakonec byl použit gradient, který je uveden v článku [29].

K dosažení lepšího rozlišení, byly poté upraveny podmínky analýzy: průtok mobilní fáze, teplota na koloně a také byla zkrácena doba analýzy.

Díky rozdílnému zastoupení jednotlivých anthokyanů v rybízu červeném a černém se pro daný druh ovoce, gradient a podmínky analýzy lišily.

Tabulka 10: Hlavní anthokyanová barviva obsažená v rybízu [29, 30, 31, 32]

Rybíz	červený	černý
Anthokyanová barviva	delphinidin 3-sambubiosid cyanidin 3-sophorosid cyanidin 3-glykosylrutinosid cyanidin 3-sambubiosid cyanidin 3-glukosid cyanidin 3-xylosylrutinosid cyanidin 3-rutinosid	delphinidin 3-glucosid delphinidin 3-rutinosid cyanidin 3-glukosid cyanidin 3-rutinosid petunidin 3-rutinosid peonidin 3-rutinosid petunidin 3-(6-coumaroyl)-glucosid cyanidin 3-(6-coumaroyl)-glucosid

Tabulka 11: Konečný gradient pro stanovení anthokyanů v rybízu

Rybíz červený			Rybíz černý		
t (min)	A	B	t (min)	A	B
0	95	5	0	95	5
40	75	25	30	75	25
45	95	5	35	95	5
T (°C)	40		T (°C)	30	

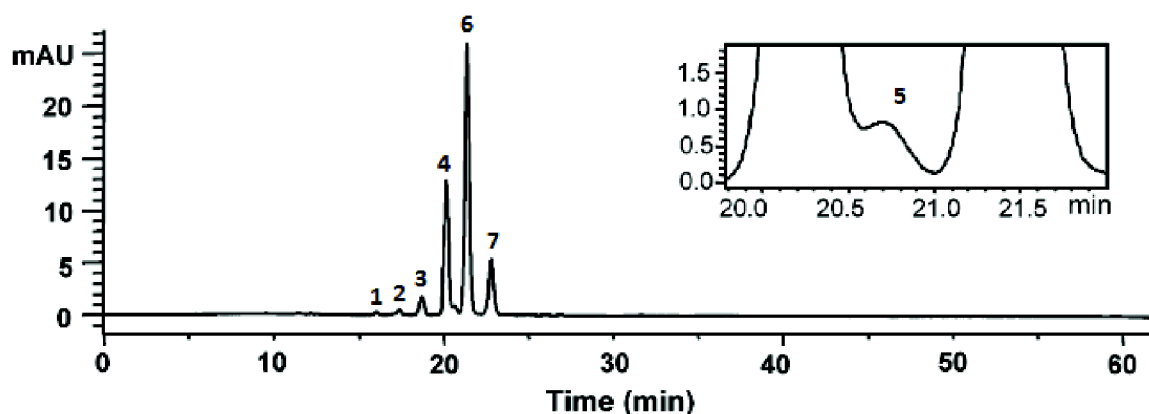
4.2.2 Identifikace jednotlivých píků anthokyanových barviv

S použitím dostupné odborné literatury byla jednotlivá anthokyanová barviva obsažená v plodech červených a černých rybízů identifikována [29, 30, 31, 32].

Na chromatogramu (Obrázek 18) jsou znázorněna jednotlivá anthokyanová barviva stanovená v plodech červeného rybízu metodou HPLC podle návodu uvedeném v *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [30].

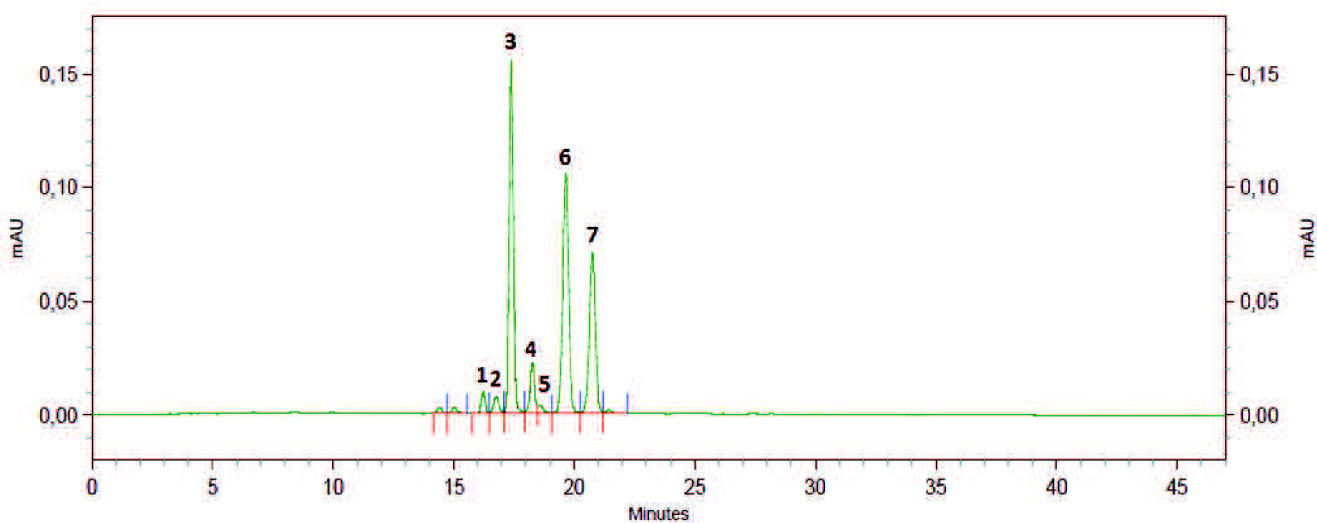
Zastoupená anthokyanová barviva u červeného rybízu eluovala v pořadí:

1. delphinidin 3-sambubiosid
2. cyanidin 3-sophorosid
3. cyanidin 3-glykosylrutinosid
4. cyanidin 3-sambubiosid
5. cyanidin 3-glukosid
6. cyanidin 3-xylosylrutinosid
7. cyanidin 3-rutinosid



Obrázek 18: Publikovaný chromatogram anthokyanových barviv červeného rybízu [30]

Chromatogram (Obrázek 19) znázorňuje zastoupení anthokyanových barviv v odrůdě Losan červeného rybízu vlastního stanovení metodou HPLC.

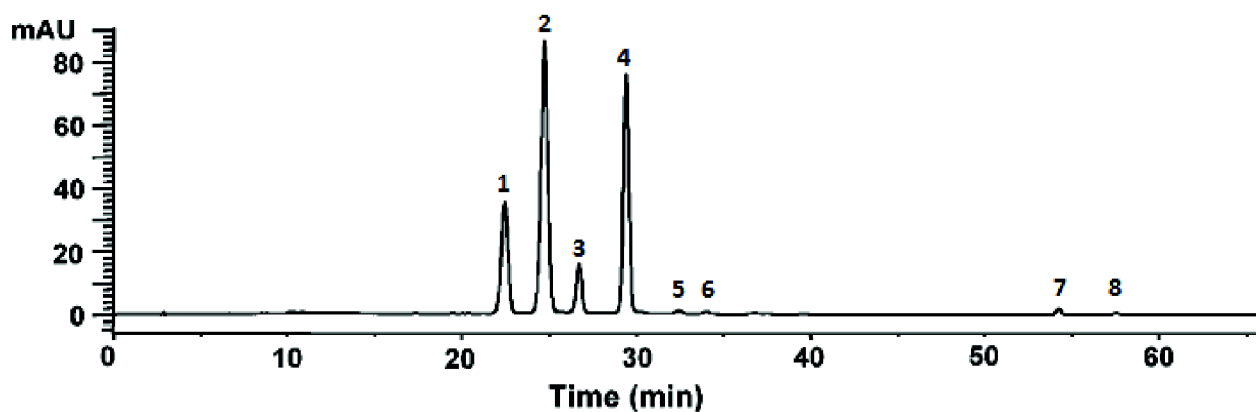


Obrázek 19: Chromatogram anthokyanových barviv odrůdy červeného rybízu Losan

Na chromatogramu (Obrázek 20) jsou znázorněna jednotlivá anthokyanová barviva stanovená v plodech černého rybízu metodou HPLC podle návodu uvedeném v *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [30].

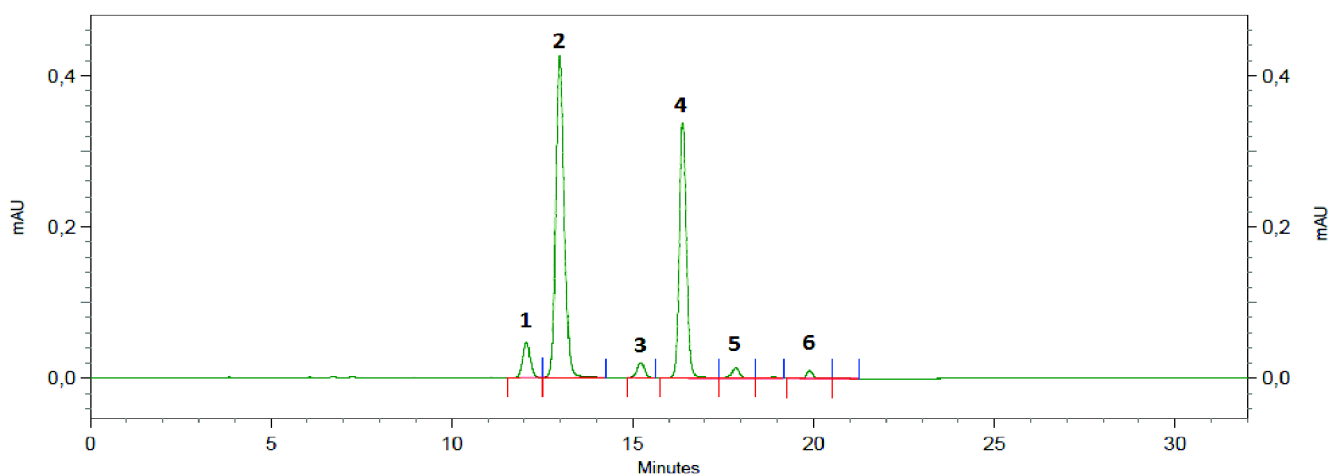
Zastoupená anthokyanová barviva u černého rybízu eluovala v pořadí:

1. delphinidin 3-glucosid
2. delphinidin 3-rutinosid
3. cyanidin 3-glukosid
4. cyanidin 3-rutinosid
5. petunidin 3-rutinoside
6. peonidin 3-rutinosid
7. petunidin 3-(6-coumaroyl)-glucosid
8. cyanidin 3-(6-coumaroyl)-glucosid



Obrázek 20: Publikovaný chromatogram anthokyanových barviv černého rybízu [30]

Chromatogram (Obrázek 21) znázorňuje zastoupení anthokyanových barviv v odrůdě Neznámého vzorku 1 černého rybízu vlastního stanovení metodou HPLC.



Obrázek 21: Chromatogram anthokyanových barviv odrůdy černého rybízu Neznámý vzorek 1

Zastoupení jednotlivých anthokyanových barviv červeného rybízu znázorněných na publikovaném chromatogramu a chromatogramu vlastního stanovení metodou HPLC je shodné. U ostatních odrůd červeného rybízu byla identifikována různá zastoupení anthokyanových barviv, např. u odrůdy Rovada byla identifikována pouze tři anthokyanová barviva (cyanidin 3-sambubiosid, cyanidin 3-xylosylrutinosid, cyanidin 3-rutinosid) (Tabulka 12). U černého rybízu se zastoupení jednotlivých anthokyanových barviv znázorněných na publikovaném chromatogramu a chromatogramu vlastního stanovení metodou HPLC liší. Vlastním stanovením nebyly u obou neznámých odrůd černého rybízu identifikovány petunidin 3-(6-coumaroyl)-glucosid a cyanidin 3-(6-coumaroyl)-glucosid (Tabulka 13).

4.2.3 Vlastní stanovení obsahu anthokyanových barviv v plodech vybraných odrůd rybízu

Podle postupu uvedeném v kapitole 3.2.3 byla ve studovaných odrůdách rybízu analyzována anthokyanová barviva.

Pomocí softwaru ChromQuest 4.0 byla provedena integrace píků jednotlivých anthokyanových barviv. Získané hodnoty ploch identifikovaných píků byly dále zpracovávány v programu Microsoft Office Excel 2010.

Výsledné hodnoty ploch identifikovaných píků anthokyanových barviv stanovené metodou HPLC v odrůdách červeného rybízu jsou uvedeny v Tabulce 12.

Tabulka 12: Plochy píků jednotlivých anthokyanových barviv v odrůdách červeného rybízu

Rybíz červený	Plocha píku anthokyanového barviva (mAU · min ⁻¹)							Σ ploch píků
Odrůda	1	2	3	4	5	6	7	
Losan	111990	124676	2035338	390130	58977	1902456	1272103	5895669
Vitan	116548		1571002	342122	33134	1767933	760678	4591417
Detvan Padochov		20143	14549	394261	28687	2506498	854446	3818584
Rubigo Lysice	99805	39218	1243543	214405	6735	1204953	422733	3231393
Detvan Želešice			11979	180172	13685	2207142	749769	3162747
Detvan Lysice				208566	11754	1751626	510245	2482191
Rubigo Želešice	54065	32859	912585	123330	9375	890780	350204	2373198
Holandský červený	105496	8368	427049	237691	28234	535141	125136	1467116
Tatran			6198	101742	9923	801169	212030	1131062
Rovada				108015		772707	158606	1039328
Σ ploch píků	487904	225263	6222244	2300435	200504	14340405	5415949	

1 (delphinidin 3-sambubiosid), 2 (cyanidin 3-sophorosid), 3 (cyanidin 3-glykosylrutinosid), 4 (cyanidin 3-sambubiosid), 5 (cyanidin 3-glukosid), 6 (cyanidin 3-xylosylrutinosid), 7 (cyanidin 3-rutinosid)

Výsledné hodnoty ploch identifikovaných píků anthokyanových barviv stanovené metodou HPLC v neznámých odrůdách černého rybízu jsou uvedeny v Tabulce 13.

Tabulka 13: Plochy píků jednotlivých anthokyanových barviv v odrůdách černého rybízu

Rybíz černý	Plocha píku anthokyanového barviva (mAU · min ⁻¹)						Σ ploch píků
Odrůda	1	2	3	4	5	6	
Neznámá odrůda 1	679204	6514988	275195	4595166	205378	116247	12386177
Neznámá odrůda 2	967366	4558694	464307	3232553	129519	98929	9451368
Σ ploch píků	1646570	11073682	739502	7827719	334897	215176	

1 (delphinidin 3-glucosid), 2 (delphinidin 3-rutinosid), 3 (cyanidin 3-glucosid), 4 (cyanidin 3-rutinosid), 5 (petunidin 3-rutinoside), 6 (peonidin 3-rutinosid)

Pro přehlednost bylo vypočteno i procentuální zastoupení každé odrůdy rybízu z celkového součtu ploch identifikovaných píků anthokyanových barviv ve všech odrůdách rybízu.

Tabulka 14: Vyjádření procentuálního zastoupení dané odrůdy z celkového součtu ploch píků anthokyanových barviv

Odrůda	Losan	Vítan	Detvan Padochov	Rubigo Lysice	Detvan Želešice	Detvan Lysice
%	20,2	15,7	13,1	11,1	10,8	8,5

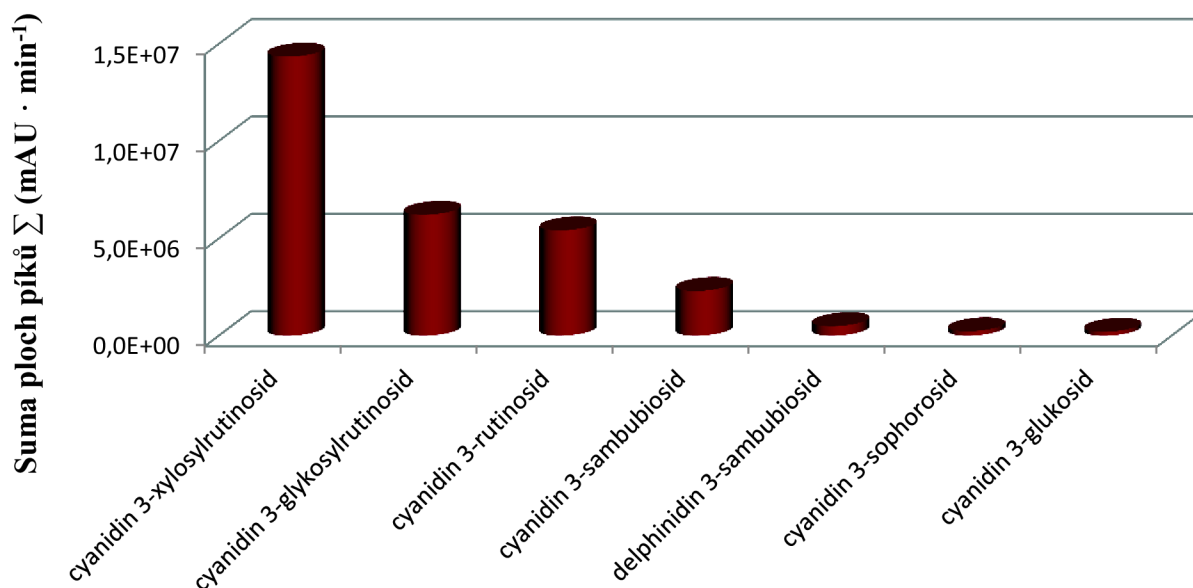
Odrůda	Rubigo Želešice	Holandský červený	Tatran	Rovada	Neznámý vzorek 1	Neznámý vzorek 2
%	8,1	5,0	3,9	3,6	56,7	43,3

Dominantním barvivem u červených rybízů byl cyanidin 3-xylosylrutinosid, v zastoupení kolem 49,1 % v plodech vybraných odrůd.

Procentuální zastoupení dalších pigmentů bylo následující:

- cyanidin 3-glykosylrutinosid – 21,3 %
- cyanidin 3-rutinosid – 18,6 %
- cyanidin 3-sambubiosid – 7,9 %
- delphinidin 3-sambubiosid – 1,7 %
- cyanidin 3-sophorosid – 0,8 %
- cyanidin 3-glucosid – 0,7 %

Zastoupení jednotlivých anthokyanových barviv v rybízu červeném je uvedeno na Obrázku 22.



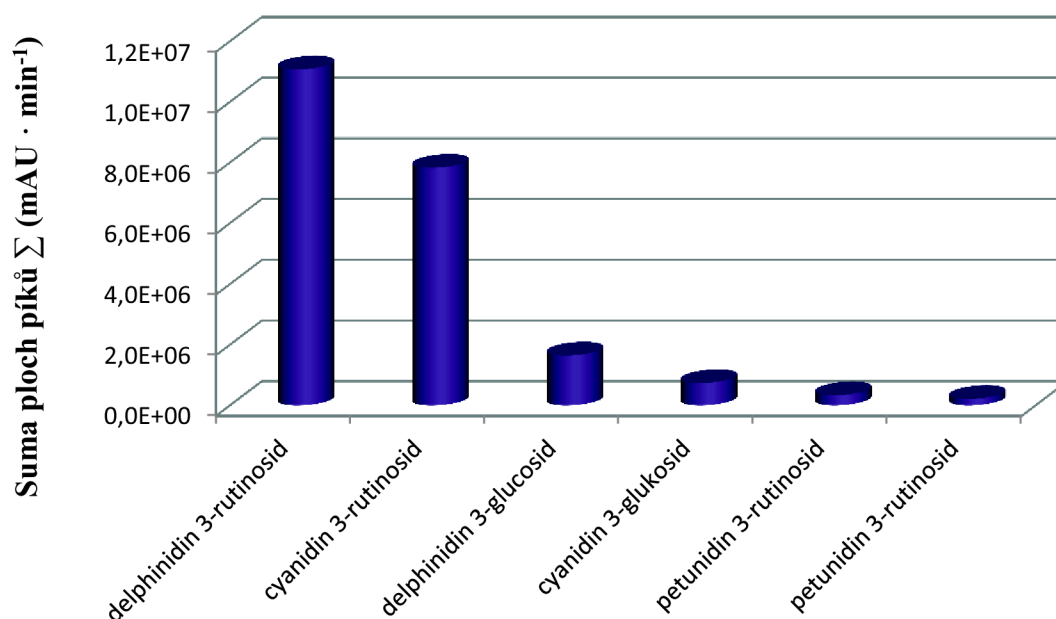
Obrázek 22: Seřazená anthokyanová barviva podle zastoupení v odrůdách červeného rybízu

Dominantním barvivem u černých rybízů byl delphinidin 3-rutinosid, v zastoupení kolem 50,7 % v plodech dvou neznámých odrůd.

Procentuální zastoupení dalších pigmentů bylo následující:

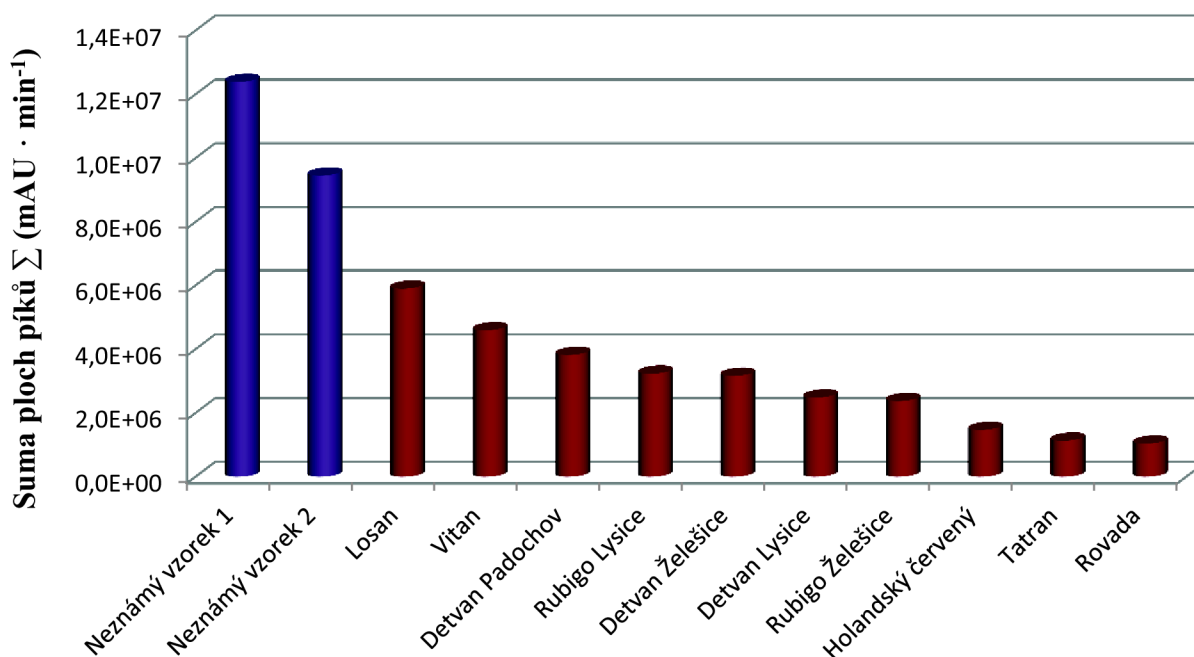
- cyanidin 3-rutinosid – 35,8 %
- delphinidin 3-glucosid – 7,5 %
- cyanidin 3-glukosid – 1,5 %
- petunidin 3-rutinoside – 3,4 %
- peonidin 3-rutinosid – 1,0 %

Zastoupení jednotlivých anthokyanových barviv v rybízu černém je uvedeno na Obrázku 23.



Obrázek 23: Seřazená anthokyanová barviva podle zastoupení v odrůdách černého rybízu

Sečtené hodnoty všech ploch píkú jednotlivých anthokyanových barviv pro každou odrůdu byly vyneseny do grafu, který uvádí pořadí 12-ti odrůd černých i červených rybízů (Obrázek 24).



Obrázek 24: Seřazené odrůdy černých a červených rybízů podle celkového obsahu anthokyanových barviv stanovené metodou HPLC

Hodnoty součtu ploch anthokyanových barviv v analyzovaných plodech vybraných odrůd červeného rybízu se pohybovaly v rozmezí od 1 039 328 do 5 895 669 mAU · min⁻¹. V plodech černého rybízu byl součet ploch anthokyanů stanoven na hodnotu 12 386 177 mAU · min⁻¹ u Neznámé odrůdy 1 a 9 451 368 mAU · min⁻¹ u Neznámé odrůdy 2.

Nejvyšší obsah anthokyanových barviv v plodech červeného rybízu byl stanoven v odrůdě Losan (plocha 5 895 669 mAU · min⁻¹). Odrůda s nejnižším množstvím anthokyanových barviv byla Rovada (plocha 1 039 328 mAU · min⁻¹). Černé rybízy obsahovaly nejvíce anthokyanů, přičemž nejvyšší zastoupení pigmentů bylo stanoveno v odrůdě Neznámý vzorek 1 (9 451 368 mAU · min⁻¹).

Ke stanoveným anthokyanům nebyly dostupné příslušné standartní vzorky, proto nemohla být vypočtena koncentrace pigmentu v mg · l⁻¹ a hodnota obsahu anthokyanu v mg · 100 g⁻¹ plodů.

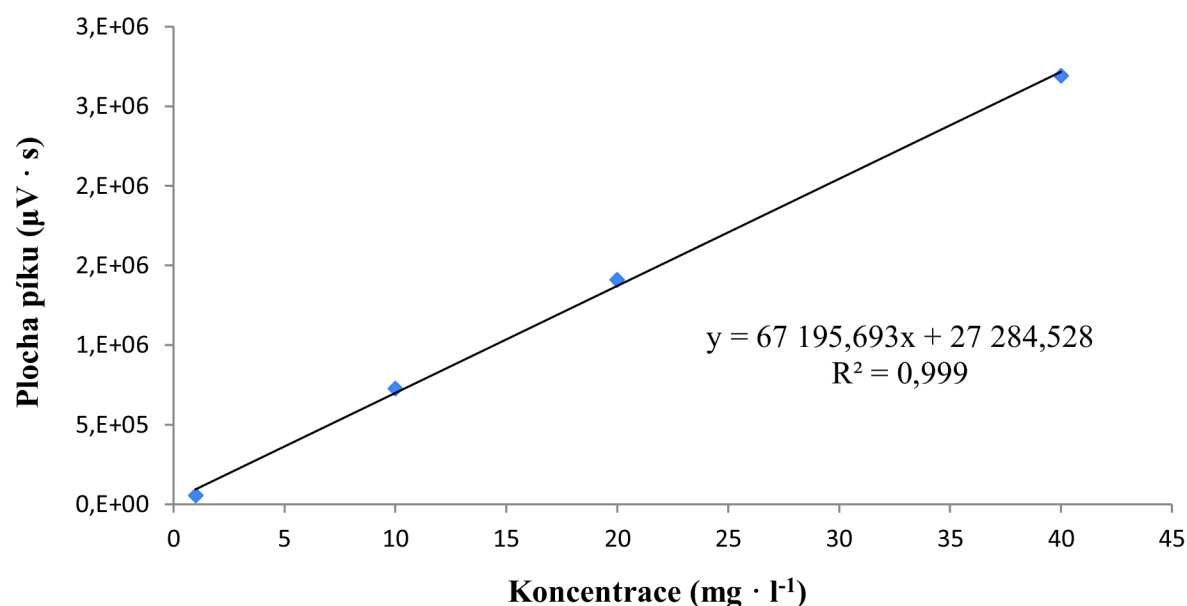
4.3 Stanovení vitamínu C metodou HPLC

Pro stanovení kyseliny askorbové v potravinách existuje mnoho postupů (kapitola 2.3.4). Většina z nich používá reverzní fáze, jako mobilní fázi fosfátový pufr a extrakční činidlo v podobě kyseliny monohydrogenfosforečné (metafosforečné). Metoda pro stanovení vitamínu C byla použita dle normy [34].

Analyzováno bylo osmnáct odrůd rybízu, dvě odrůdy rybízu černého, deset odrůd rybízu červeného a šest odrůd rybízu bílého. Každý vzorek byl analyzován 3krát.

4.3.1 Sestrojení kalibrační závislosti

Pracovní postup k přípravě roztoků kalibrační křivky je uveden v kapitole 3.3.2 a analýza kalibračních roztoků je popsána v kapitole 3.3.3.



Obrázek 25: Kalibrační křivka

Výsledné hodnoty ploch píků kyseliny askorbové, které byly získány integrací v systému Breeze jsou uvedeny v Tabulce 15.

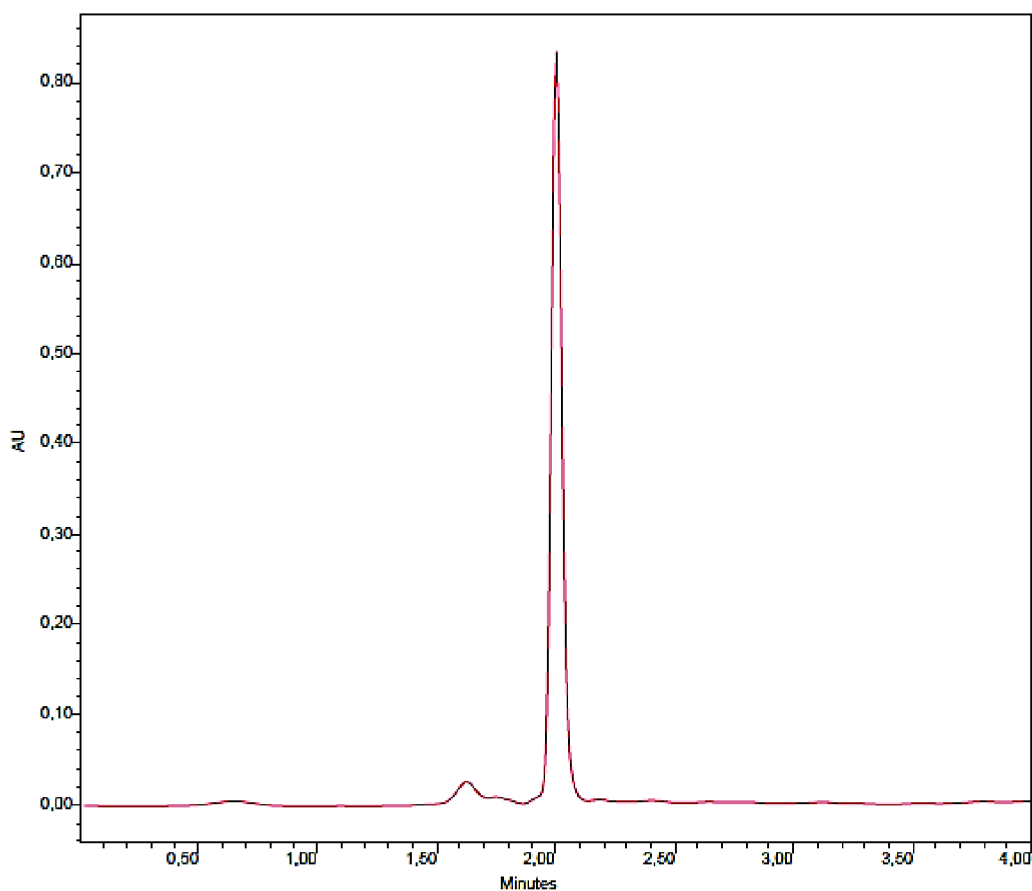
Tabulka 15: Hodnoty kalibrační křivky

Koncentrace ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)	Plocha píku ($\mu\text{V} \cdot \text{s}$)
1	54196
10	725978
20	1409647
40	2690211

4.3.2 Stanovení vitamínu C

Příprava vzorků rybízu pro analýzu je uvedena v kapitole 3.3.2. Analýza trvala 4 minuty, pro všechny odrůdy rybízu. Kyselina askorbová eluovala ve druhé minutě. Po analýze červených a bílých rybízů byla kolona 2 minut proplachována mobilní fází z důvodu vymytí dalších detekovaných látek, které by mohly ovlivňovat následující analýzu.

Na chromatogramu (Obrázek 26) je znázorněn pík kyseliny askorbové analyzované u odrůdy Losan, která obsahovala nejvíce vitamínu C z červených odrůd rybízu.



Obrázek 26: Chromatogram kyseliny askorbové u vzorku odrůdy Losan

4.3.3 Výsledné hodnoty množství vitamínu C v plodech vybraných odrůd rybízů

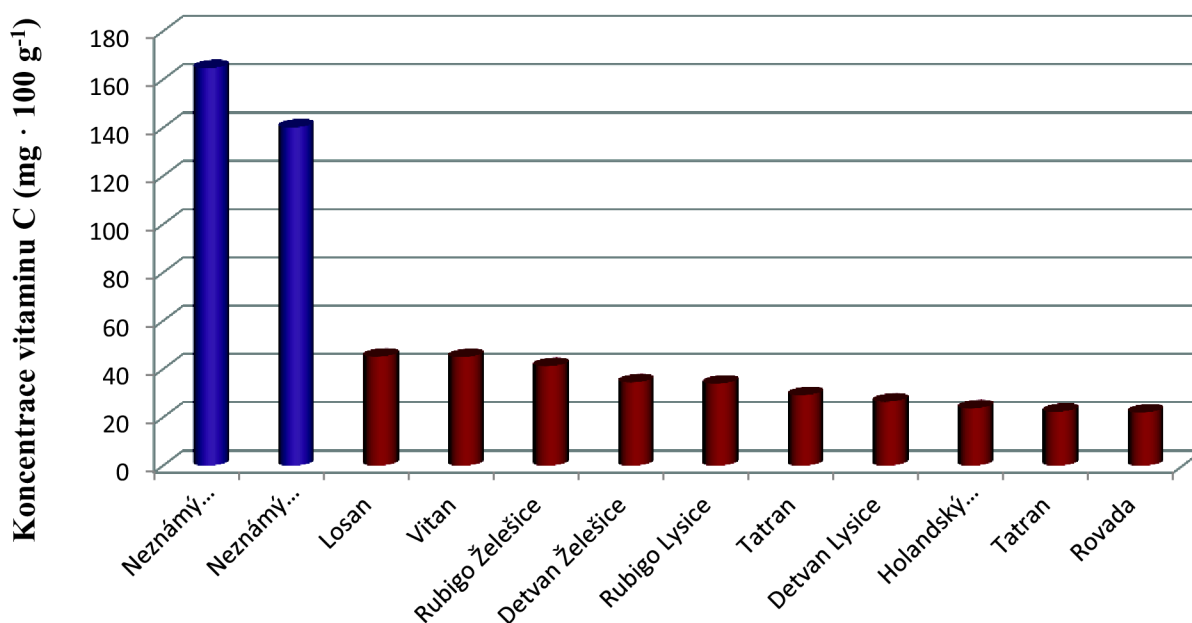
Podle postupu uvedeném v kapitole 3.3.4 byl ve studovaných odrůdách rybízu stanoven obsah vitamínu C. Pomocí softwaru Brezee byla provedena integrace píků kyseliny askorbové. Všechny vzorky byly změřeny třikrát a výsledky byly statisticky zpracovány pomocí programu Microsoft Office Excel 2010.

Výsledné hodnoty obsahu vitamínu C v odrůdách rybízu stanovené metodou HPLC jsou uvedeny v Tabulce 16.

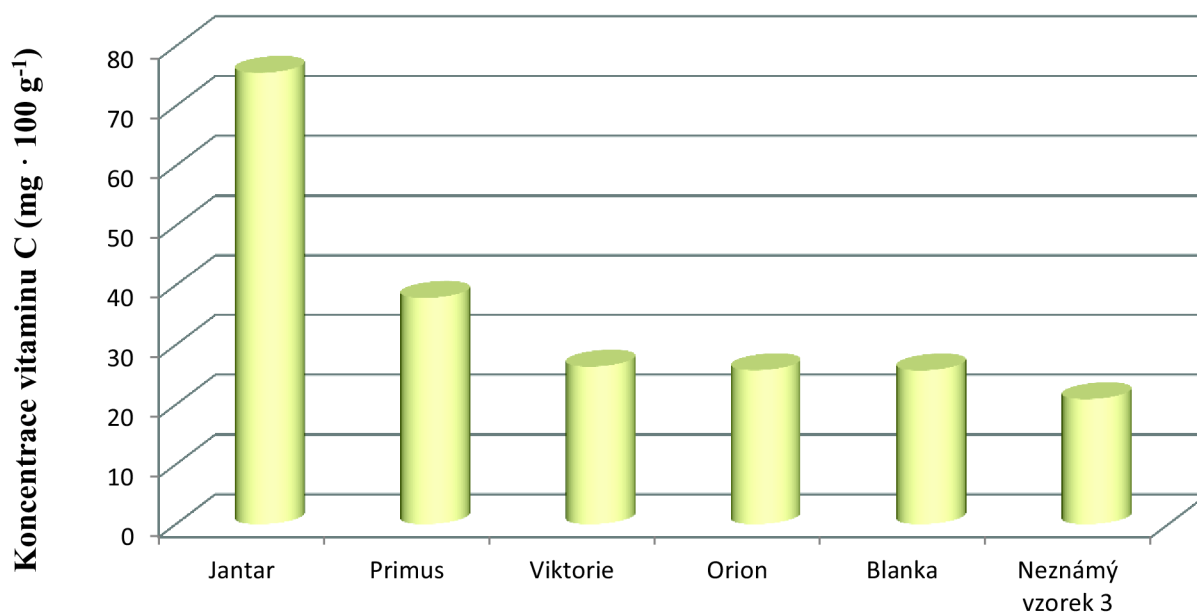
Tabulka 16: Obsah vitamínu C v jednotlivých odrůdách rybízu

Červený rybíz	Obsah vitamínu C (mg · 100 g ⁻¹)	Bílý rybíz	Obsah vitamínu C (mg · 100 g ⁻¹)
Detvan Želešice	34,52 ± 3,33	Blanka	25,72 ± 2,20
Detvan Lysice	34,04 ± 0,30	Primus	37,85 ± 5,94
Detvan Padochov	22,39 ± 1,71	Jantar	75,54 ± 5,65
Holandský červený	23,76 ± 3,77	Orion	25,75 ± 4,09
Rubigo Želešice	41,28 ± 4,03	Viktorie	26,36 ± 7,35
Rubigo Lysice	34,04 ± 1,96	Neznámý vzorek 3	20,91 ± 1,36
Losan	45,20 ± 1,30		
Tatran	29,23 ± 2,24	Černý rybíz	
Vitan	45,00 ± 1,72	Neznámý vzorek 1	140,17 ± 13,32
Rovada	22,06 ± 1,33	Neznámý vzorek 2	164,71 ± 9,60

Pro srovnání různých odrůd rybízu podle stanoveného obsahu kyseliny askorbové v mg na 100 g plodů, jsou na Obrázcích 27 a 28 uvedeny seřazené odrůdy červených, černých a bílých rybízů.



Obrázek 27: Seřazené odrůdy černých a červených rybízů dle obsahu vitamínu C



Obrázek 28: Seřazené odrůdy bílých rybízů dle obsahu vitamínu C

Pro porovnání obsahu vitamínu C v různých odrůdách rybízu, jsou v Tabulce 17 uvedeny publikované hodnoty obsahu kyseliny askorbové v plodech různých odrůd rybízu v mg na 100 g čerstvých plodů.

Tabulka 17: Publikované hodnoty obsahu kyseliny askorbové stanovené metodou spektrofotometrické reflektometrie [2, 3]

Rybíz	Odrůda	Obsah askorbové kyseliny (mg · 100 g ⁻¹)
červený	Rovada	40
červený	London Market	35,6
bílý	White Versailles	38,1
černý	Ben Lomond	164

K porovnání obsahu vitamínu C v rybících a celoročně nejvíce konzumovaném ovoci v České republice, jsou v Tabulce 18 uvedeny hodnoty obsahu kyseliny askorbové v mg na 100 g čerstvých plodů různého ovoce.

Tabulka 18: Obsah vitamínu C v jiném ovoci [19]

Ovoce	Obsah askorbové kyseliny (mg · 100 g ⁻¹)
Jablko	1,5-5,0
Pomeranč	30-60
Hroznové víno	2-5
Banán	9-32
Rybíz červený	20-50
Rybíz černý	110-300

Hodnoty vitamínu C v analyzovaných plodech vybraných odrůd červeného rybízu se pohybovaly v rozmezí přibližně 22–45 mg kyseliny askorbové ve 100 g plodů. V plodech černého rybízu se obsah vitamínu C pohyboval kolem hodnoty 140-164 mg · 100 g⁻¹ plodů a v bílém rybízu bylo rozmezí od 20–75 mg · 100 g⁻¹ plodů. Nejvyšší množství vitamínu C v plodech červeného rybízu bylo stanoveno v odrůdách Losan 45,20 mg a Vitan 45 mg ve 100 g plodů. Další odrůda s poměrně vysokým množstvím vitamínu C byla Rubigo Želešice 41,28 mg · 100 g⁻¹. Odrůda s nejnižším množstvím vitamínu C byla Rovada s obsahem kyseliny askorbové 22,06 mg ve 100 g plodů. Černé rybízy obsahovaly nejvíce vitamínu C, odrůda Neznámého vzorku 2 164,71 mg a Neznámý vzorku 1 obsahoval 140,17 mg na 100 g plodů. U bílých rybízů měla výrazně nejvyšší zastoupení kyseliny askorbové odrůda Jantar se 75,54 mg · 100 g⁻¹ plodů. Naopak nejnižší obsah vitamínu C byl stanoven u Neznámé odrůdy 3 20,91 mg · 100 g⁻¹ plodů. Nízký obsah kyseliny askorbové byl stanoven také u odrůd Blanka 25,72 mg, Orion 25,75 mg a Viktorie 26,36 mg ve 100 g plodů.

4.4 Stanovení antioxidační kapacity metodou DPPH

Postup pro stanovení antioxidační kapacity v plodech bílých odrůd rybízu metodou DPPH byl čerpán z prací, které se touto problematikou už zabývaly [34, 35].

Příprava vzorků rybízu bílého pro stanovení antioxidační kapacity je uvedena v kapitole 3.4.2. Pomocí UV/VIS spektrofotometru byla měřena absorbance vzorků, po dobu 6 minut v časovém intervalu 10 s, při vlnové délce 517 nm.

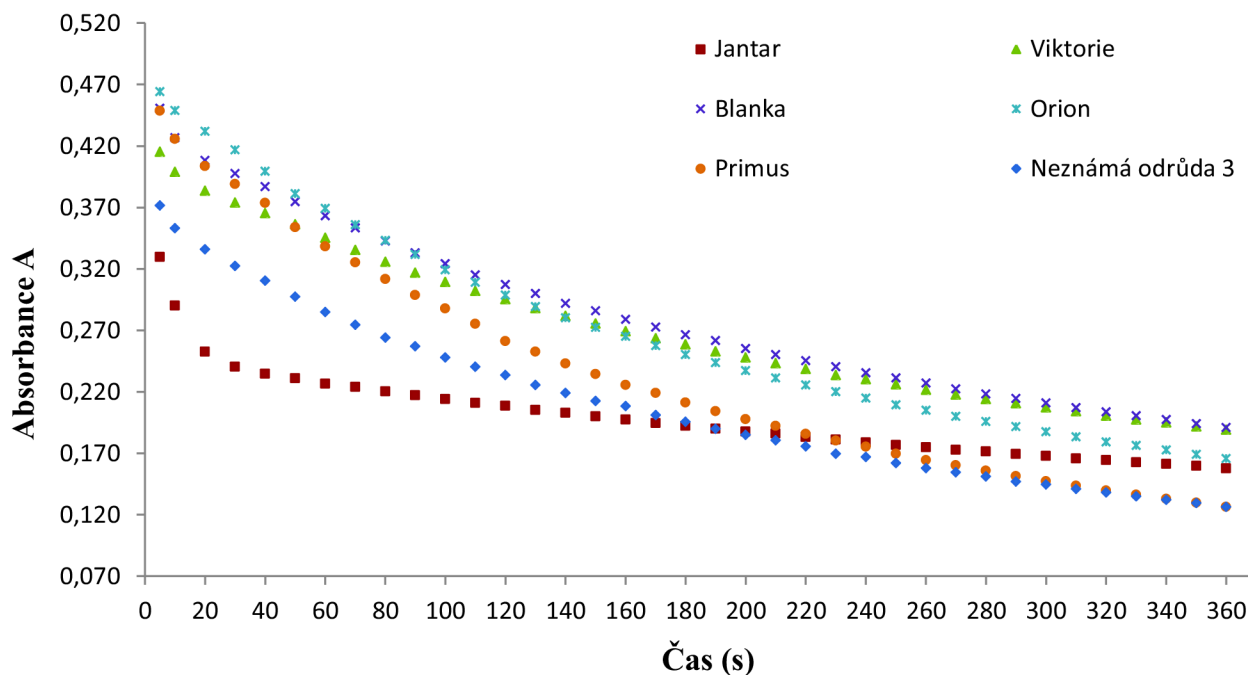
K zajištění optimálního časového průběhu reakce antioxidantů s volným radikálem DPPH musely být vzorky vždy minimálně 15krát ředěny. Vhodným naředěním vzorků se zamezilo příliš rychlé reakci, která by znemožnila odečíst absorbanci pouhým okem.

Příklad naměřených hodnot poklesu absorbance extraktu bílé odrůdy rybízu uvádí Tabulka 19.

Tabulka 19: Odečtené hodnoty absorbancí extraktů odrůdy Orion

čas (s)	A ₁	A ₂	A ₃	čas (s)	A ₁	A ₂	A ₃	čas (s)	A ₁	A ₂	A ₃
5	0,442	0,448	0,457	130	0,279	0,279	0,283	240	0,216	0,214	0,215
10	0,425	0,427	0,444	140	0,271	0,272	0,274	250	0,21	0,208	0,210
20	0,408	0,419	0,424	150	0,264	0,264	0,267	260	0,206	0,204	0,205
30	0,393	0,401	0,404	160	0,257	0,257	0,259	270	0,201	0,199	0,200
40	0,376	0,383	0,385	170	0,456	0,466	0,471	280	0,197	0,195	0,196
50	0,364	0,37	0,374	130	0,279	0,279	0,283	290	0,193	0,191	0,191
60	0,352	0,356	0,36	140	0,271	0,272	0,274	300	0,189	0,187	0,187
70	0,339	0,344	0,347	180	0,249	0,250	0,252	310	0,185	0,182	0,183
80	0,328	0,332	0,335	190	0,243	0,243	0,245	320	0,181	0,178	0,179
90	0,316	0,320	0,322	200	0,238	0,236	0,238	330	0,178	0,175	0,176
100	0,306	0,309	0,312	210	0,232	0,23	0,232	340	0,175	0,171	0,172
110	0,296	0,298	0,302	220	0,226	0,225	0,226	350	0,171	0,168	0,168
120	0,287	0,288	0,293	230	0,221	0,219	0,220	360	0,168	0,164	0,165

Z naměřených hodnot absorbancí vzorků bílého rybízu byla sestrojena závislost poklesu absorpance na čase (Obrázek 29).



Obrázek 29: Závislost poklesu absorpance extraktu na čase

4.4.1 Výsledné hodnoty zhášecí aktivity extraktů z odrůd bílých rybízů

Podle postupu uvedeném v kapitole 3.4.4 byla stanovena zhášecí aktivita extraktů z plodů bílých odrůd rybízů. K výpočtu zhášecí aktivity všech extraktů byla vybrána hodnota absorpance v čase 70 s, a to jako průměrná hodnota absorpance ze tří měření.

Tabulka 20: Výsledné hodnoty zhášecí aktivity extraktů bílých odrůd rybízů

Rybíz bílý	Průměrná absorpance A (v čase 70 s)	Zhášecí aktivita (%)
Jantar	0,224	61,71
Neznámý vzorek 3	0,275	53,08
Primus	0,325	44,39
Viktorie	0,335	42,68
Blanka	0,353	39,60
Orion	0,356	39,15

Zhášecí aktivitu extraktů lze charakterizovat jako aktivitu daných extraktů v daném čase eliminovat určité množství přítomných molekul radikálu DPPH. Např. odrůda Jantar eliminuje v čase 70 s 61,71 % přítomných molekul DPPH.

Zhášecí aktivity odrůd bílého rybízu se pohybovaly v rozmezí od 61,7 % do 39,15 %. Nejvyšší zhášecí aktivitu vykazovala odrůda Jantar, u které byl také stanoven nejvyšší obsah antioxidačního vitamínu C. Naopak nejnižší aktivitu vykazovaly odrůdy Orion a Blanka, což koresponduje s nejnižším stanoveným obsahem vitamínu C.

5 ZÁVĚR

Teoretická část diplomové práce informuje o rodu *Ribes*. Zabývá se popisem rostliny, obsahem nutričně významných látek a využitím plodů pro potravinářské účely. V dalších kapitolách je věnována pozornost anthokyanům, vitaminu C a antioxidační kapacitě.

Plody rybízu jsou významným zdrojem anthokyanových barviv a vitaminu C, což jsou látky řadící se k antioxidantům. V této diplomové práci byl stanoven obsah anthokyanů v barevných odrůdách rybízu, vitamin C ve všech odrůdách rybízu a také byla stanovena antioxidační kapacita extraktů z plodů bílých odrůd rybízu.

Spektrofotometrickou metodou pH diferenciální byl stanoven celkový obsah monomerního pigmentu, jako ekvivalentu cyanidin 3-glukosidu. Nejvíce monomerního anthokyanu bylo stanoveno v obou odrůdách černého rybízu. Neznámý vzorek 1 obsahoval $28,73 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ čerstvých plodů rybízu a Neznámý vzorek 2 $27,18 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ plodů. Z červených rybízů obsahovala nejvíce monomeru odrůda Losan $20,91 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ a nejméně odrůda Tatran $0,53 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ plodů ovoce. Odrůda Tatran byla sbírána předčasně a neúplná zralost plodů ovlivnila obsah látek v těchto plodech. Během zrání dochází k různým reakcím, které jsou zodpovědné za tvorbu tmavších a stabilnějších červených pigmentů, což potvrdil stanovený nízký obsah monomerního pigmentu v odrůdě Tatran. Další odrůdy s nízkým obsahem byly Holandský červený ($0,99 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ plodů) a Rubigo Želešice ($1,31 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ plodů). V porovnání s odrůdou Losan, měly zbylé odrůdy velmi nízký obsah monomeru.

Touto metodou bylo stanoveno i procentuální zastoupení polymerní barvy v plodech. Nejvyšší zastoupení polymerních pigmentů bylo stanoveno v odrůdě Holandský červený 36,05 % a nejméně pak v odrůdě Losan 6,81 %. Čerstvé ovocné šťávy by měly mít nízké procento polymerní barvy (obvykle méně než 10 %), přičemž u zpracovaných a uskladněných vzorků bude procentuální zastoupení polymerní barvy mnohem vyšší (30 % nebo více). Hodnota polymerní barvy je tedy velmi nestálá a liší se v závislosti na typu vzorku, podmínkách zpracování a uskladnění.

Stanovené obsahy a rozmezí množství monomerních a polymerních pigmentů v plodech rybízu se v různých publikacích liší. Např. v publikaci *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* [6], ze které byla metoda stanovení použita, je uveden obsah monomerních pigmentů v černém rybízu na $130\text{--}400 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ čerstvých plodů, což je široké rozmezí. Lze tedy usoudit, že obsah monomerních a polymerních barviv závisí na: druhu odrůdy, typu vzorku, době a podmínkách skladování a hlavně na zpracování plodů.

Dále byla identifikována jednotlivá anthokyanová barviva pomocí metody HPLC. Ke stanovovaným anthokyanům nebyly dostupné příslušné standartní vzorky, proto nemohla být vypočtena hodnota obsahu anthokyanů v $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ plodů. Podle dostupných publikací, byla pouze identifikována jednotlivá barviva a byl porovnán jejich obsah na základě ploch pík jednotlivých pigmentů.

Dominantním barvivem obsaženým v plodech studovaných odrůd červených rybízů byl stanoven cyanidin 3-xylosylrutinosid, v zastoupení kolem 49,1 %. Nejméně zastoupeného pigmentu bylo cyanidin 3-glukosidu a to pouze 0,7 % ve všech červených odrůdách. Ve dvou neznámých odrůdách černých rybízů byl nejvíce zastoupen delphinidin 3-rutinosid, kolem 50,7 % a nejméně bylo stanoveno peonidin 3-rutinosidu 1,0 %.

Nejvíce anthokyanových barviv obsahovaly černé rybíz, o čemž svědčí hodnota součtu všech ploch píků $12\,386\,177 \text{ mAU} \cdot \text{min}^{-1}$ u Neznámé odrůdy 1 a $9\,451\,368 \text{ mAU} \cdot \text{min}^{-1}$ u Neznámé odrůdy 2.

Nejvyšší obsah anthokyanových barviv v plodech červeného rybízu byl stanoven opět v odrůdě Losan (plocha $5\,895\,669 \text{ mAU} \cdot \text{min}^{-1}$). Odrůda s nejnižším množstvím anthokyanových barviv byla Rovada (plocha $1\,039\,328 \text{ mAU} \cdot \text{min}^{-1}$).

PH diferenciální metoda a HPLC jsou nejběžnější metody užívané pro kvantifikaci anthokyanů ve vzorku. HPLC poskytuje přesné hodnoty koncentrace jak jednotlivých, tak celkových anthokyanů a také ji lze použít k porovnání zastoupení různých pigmentů obsažených v různých odrůdách. Naopak pH diferenciální metoda je používána spíše pro orientační stanovení obsahu celkové koncentrace anthokyanů ve vzorcích plodů ovoce a hlavně se využívá i díky jejímu rychlému, jednoduchému provedení a relativně nízké ceně.

Také byl stanoven obsah vitamínu C ve všech odrůdách rybízu. Nejvyšší zastoupení askorbové kyseliny bylo zjištěno v neznámých odrůdách černých rybízů, konkrétně $164,71 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ plodů v odrůdě Neznámého vzorku 2 a Neznámý vzorek 1 obsahoval $140,17 \text{ mg}$ na 100 g plodů. Nejvyšší množství vitamínu C v plodech červeného rybízu bylo stanoveno v odrůdách Losan $45,20 \text{ mg}$ a Vitan 45 mg ve 100 g plodů. Další odrůda s poměrně vysokým množstvím vitamínu C byla Rubigo Želešice $41,28 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. Odrůda s nejnižším množstvím vitamínu C byla Rovada s obsahem kyseliny askorbové $22,06 \text{ mg}$ ve 100 g plodů. U bílých rybízů měla výrazně nejvyšší zastoupení kyseliny askorbové odrůda Jantar se $75,54 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ plodů. Naopak nejnižší obsah vitamínu C byl stanoven u Neznámé odrůdy 3 $20,91 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ plodů. Nízký obsah kyseliny askorbové byl stanoven také u odrůd Blanka $25,72 \text{ mg}$, Orion $25,75 \text{ mg}$ a Viktorie $26,36 \text{ mg}$ ve 100 g plodů. Obsah vitamínu C je ovlivňován charakterem klimatických podmínek v průběhu roku a velmi výrazně i samotnými odrůdami.

Jelikož vitamin C a anthokyanová barviva patří do skupiny antioxidantů, byla stanovena i antioxidační kapacita vzorků rybízu. Aktivita extraktů z plodů rybízů eliminovat radikály, konkrétně volný radikál DPPH, však byla proměřena pouze u odrůd bílých rybízů, které mají obsah stanovovaných antioxidantů (anthokyanů a vitamínu C) nejnižší. Přesto byla potvrzena antioxidační aktivita vitamínu C. Nejvyšší antioxidační kapacitu vykazoval vzorek odrůdy Jantar ($61,71 \%$), u které byl také stanoven nejvyšší obsah vitamínu C. Naopak nejnižší antioxidační kapacitu vykazovaly vzorky odrůd Orion ($39,15 \%$) a Blanka ($39,60 \%$), což koresponduje s nejnižším stanoveným obsahem vitamínu C v plodech bílých rybízů. Stanovení antioxidační kapacity u vzorků bílých rybízů, potvrdilo souvislost s obsahem stanovovaného vitamínu C. Používaná metoda DPPH se řadí spíše k metodám kontrolním a poskytuje méně přesné hodnoty, pokud není prováděna automaticky.

Antioxidační účinky vykazuje mnoho dalších přírodních látek, jako jsou vitamin E, karotenoidy a další polyfenolické sloučeniny. V řadě experimentálních studií bylo prokázáno, že antioxidační aktivita rostlinných fenolických látek je mnohem vyšší, než účinek samotných vitaminů, což může být předmětem pro další experiment.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] MARKOVÁ, L.: *Zástupce drobného ovoce - rybíz a jeho nutriční charakteristiky*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. 2011. 52 s. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D..
- [2] PANTELIDIS, G., VASILAKAKIS, M., MANGANARIS G., DIAMANTIDIS, G.: Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. *Food Chemistry*. 2007, vol. 102, 3, 777-783. ISSN 03088146. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.06.021. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814606004833>
- [3] IVERSEN, C. K., VASILAKAKIS, M., MANGANARIS, G., DIAMANTIDIS, G.: Black Currant Nectar: Effect of Processing and Storage on Anthocyanin and Ascorbic Acid Content. *Journal of Food Science*. 1999, vol. 64, 1, 37-41. ISSN 0022-1147. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1999.tb09856.x. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.1999.tb09856.x>
- [4] ANDERSEN, H., VAGN-PEDERSEN, O.: Sortsafproevning af 7 solbaersorter. *Groen viden*. 1993. 78. Danish Institute of Agricultural Sciences, Aarslev, Denmark.
- [5] CASTAÑEDA-OVANDO, A., PACHECO-HERNÁNDEZ, Ma. L., PÁEZ-HERNÁNDEZ, Ma. E., RODRÍGUEZ, J. A., GALÁN-VIDAL, C. A.: Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*. 2009, vol. 113, 4, 859-871. ISSN 03088146. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.09.001. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814608010674>
- [6] GIUSTI, M. M., WROLSTAD, R. E.: Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. United States: John Wiley and Sons Inc. 2001, 1000.
- [7] KYZLINK, V.: *Skladování a zpracování zahradnických plodin*. 1. Vyd. Praha: Skriptum. 1968. 443.
- [8] VELÍŠEK, J., HAJŠLOVÁ, J.: *Chemie potravin II*. 3. vyd. Havlíčkův Brod: OSSIS. 2009. 644. ISBN 978-86659-16-9.
- [9] Státní zemědělská a potravinářská inspekce. *Chemické látky v potravinách* [online]. 2011 [cit. 2013-04-21]. Dostupné z: <http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1005724&nid=11324>
- [10] Státní zemědělská a potravinářská inspekce. *Vybrané předpisy ČR* [online]. 2010 [cit. 2013-04-21]. Dostupné z: <http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1005724&nid=11324>

- [11] WELCH, C., WU, Q., SIMON, J.: Recent Advances in Anthocyanin Analysis and Characterization. *Current Analytical Chemistry*. 2008-04-01, vol. 4, 2, 75-101. ISSN 15734110. DOI: 10.2174/157341108784587795.
Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article>
- [12] DELGADO-VARGAS, F., JIMÉNEZ, A. R., PAREDES-LÓPEZ, O.: Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains - Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2000, vol. 40, 3, 173-289. ISSN 1040-8398. DOI: 10.1080/10408690091189257.
Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408690091189257>
- [13] SOMMER, L.: *Základy analytické chemie II*. 1. vyd. Brno: VUTIUM. 2000, 347. ISBN 80-214-1742-0.
- [14] URBAN, J.: Chromatografie - Jiří Urban. *Chromatografie* [online]. 2008 [cit. 2013-04-21]. Dostupné z: <http://chemie.jiriurban.cz/index.php?clanek=3>
- [15] ULLRICH K.: *Vitamin C*. Munich: GRIN Publishing GmbH. 2001. 13. ISBN (eBook) 978-3-638-19295-8. DOI: 10.3239/9783638192958
Available from: <http://www.grin.com/en/e-book/13723/vitamin-c>
- [16] STRUNECKÁ, A., PATOČKA, J.: *Doba jedová*. Vyd. 1. Praha: Triton. 2011, 295. ISBN 978-80-7387-469-8.
- [17] VODRÁŽKA, Z.: *Biochemie*. 2. oprav. vyd. Praha: Academia. 1996, 191. ISBN 80-200-0600-1.
- [18] FENNEMA, O. R.: *Food chemistry*. 3. Ed. New York: Marcel Dekker, Inc. 1996, 1069. ISBN 08-247-9691-8.
- [19] Počítačový výukový systém programů a databází COMENIUS 2000. JANČÁŘ, L. SICHOVÁ, L.: *Vitamin C* [online]. 2005 [cit. 2013-04-21].
Dostupné z: <http://www.ped.muni.cz/wchem/comenius2000/vitaminC/index.htm>
- [20] Ministerstvo zemědělství (eAGRI). *Ostatní předpisy ČR* [online]. 2009-2011 [cit. 2013-04-21]. Dostupné z: <http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/ostatni/100065067.html>
- [21] HENRY, C., CHAPMAN, C.: *The nutrition handbook for food processors*. Repr. Boca Raton, FL: CRC Press. 2002, 483. ISBN 08-493-1543-3.
- [22] NOVÁKOVÁ, L., SOLICH, P., SOLICHOVÁ, D.: HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2008, roč. 27, 10, 942-958. ISSN 01659936.
DOI: 10.1016/j.trac.2008.08.006.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993608001805>

- [23] ARYA, S. P., MAHAJAN, M., JAIN, P.: Non-spectrophotometric methods for the determination of Vitamin C. *Analytica Chimica Acta*. 2000, vol. 417, 1, 1-14. ISSN 00032670. DOI: 10.1016/S0003-2670(00)00909-0.
Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267000009090>
- [24] BURINI, G., MAHAJAN, M., JAIN, P.: Development of a quantitative method for the analysis of total l-ascorbic acid in foods by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2007, vol. 1154, 1-2, 97-102. ISSN 00219673. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.03.013.
Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967307004803>
- [25] KHAN, M. M. R., RAHMAN, M. M., ISLAM, M. S., BEGUM, S. A.: A Simple UV-spectrophotometric Method for the Determination of Vitamin C Content in Various Fruits and Vegetables at Sylhet Area in Bangladesh. *Journal of Biological Sciences*. 2006-2-1, vol. 6, 2, 388-392. ISSN 17273048. DOI: 10.3923/jbs.2006.388.392.
Available from: <http://www.scialert.net/abstract/?doi=jbs.2006.388.392>
- [26] PAULOVÁ, H., BOCHOŘÁKOVÁ, H., TÁBORSKÁ, E.: Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické Listy*. 2004, 98, 174-179.
- [27] CARLSEN, M. H., colleagues. The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutrition Journal*. 2010, vol. 9, 1, 138. ISSN 1475-2891. DOI: 10.1186/1475-2891-9-3.
Available from: <http://www.nutritionj.com/content/9/1/3>
- [28] ZLOCH, Z., ČELAKOVSKÝ, J., AUJEZDSKÁ, A.: *Stanovení obsahu polyfenolů a celkové antioxidační kapacity v potravinách rostlinného původu*. Plzeň. 2004. Závěrečná zpráva o plnění výzkumného projektu podpořeného Nadačním fondem Institutu Danone na Ústavu hygieny Lékařské fakulty UK.
Dostupné z: <http://www.institut-danone.cz/data/studie/pridelene-granty/2004-03.pdf>
- [29] BORGES, G., DEGENEVE, A., MULLEN, W., CROZIER, A.: Identification of Flavonoid and Phenolic Antioxidants in Black Currants, Blueberries, Raspberries, Red Currants, and Cranberries. *J. Agric. Food Chem.*. 2010, vol. 58, 7, 3901-3909. ISSN 0021-8561. DOI: 10.1021/jf902263n.
Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf902263n>
- [30] WU, X., GU, L., PRIOR, R. L., MCKAY, S.: Characterization of Anthocyanins and Proanthocyanidins in Some Cultivars of Ribes, Aronia, and Sambucus and Their Antioxidant Capacity. *J. Agric. Food Chem.*. 2004, vol. 52, 26, 7846-7856. ISSN 0021-8561. DOI: 10.1021/jf0486850.
Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0486850>
- [31] STÓJ, A., TARGOŃSKI, Z., MALIK, A.: Use of anthocyanin analysis for detection of berry juice adulterations. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 2006, 5, 73-85.
Available from: http://www.food.actapol.net/pub/6_1_2006.pdf

- [32] KÄHKÖNEN, M. P., HEINÄMÄKI, J., OLLILAINEN, V., HEINONEN, M.: Berry anthocyanins: isolation, identification and antioxidant activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2003, vol. 83, 14, 1403-1411. ISSN 0022-5142. DOI: 10.1002/jsfa.1511. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.1511>
- [33] CHAOVANALIKIT, A., THOMPSON, M. M., WROLSTAD, R. E.: Characterization and Quantification of Anthocyanins and Polyphenolics in Blue Honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.). *J. Agric. Food Chem.*. 2004, vol. 52, 4, 848-852. ISSN 0021-8561. DOI: 10.1021/jf030509o. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf030509o>
- [34] ČSN EN 14230 (56 0062): 2004.: *Potraviný – Stanovení vitamínu C metodou HPLC*. Praha: Český normalizační institut. 1999.
- [35] PALOVÁ, P.: *Stanovení obsahu vitamínu C v plodech dřínu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. 2008. 67 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.
- [36] MARTINKOVÁ, Z.: *Stanovení antioxidační aktivity fenolických látek v pivu*. Univerzita Pardubice. 2009. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice. Vedoucí práce Ing. Lenka Česlová, Ph.D., (roz. Kolářová).

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

AA	(ascorbic acid) – askorbová kyselina
AAPH	(2,2-azobis(isobutyrimidamid)-dihydrochloride) – 2,2-azobis(isobutyrimidamid)-dihydrochlorid
ABTS	(2,2-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonate)) – 2,2-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)
APCI	(atmospheric pressure chemical ionization) – chemická ionizace za atmosférického tlaku
ATE	(alpha-tocopherol equivalents) – ekvivalent α -tokoferolu (1 mg vitamínu E ATE = 1,5 IU, 1 IU racemické směsi = 0,45 mg α -tokoferol)
CE	(capillary electrophoresis) – kapilární elektroforéza
CZE	(capillary zone electrophoresis) – kapilární zónová elektroforéza
DAD	(diode array detector) – detektor diodového pole
DCIP	(2,6-dichlorophenolindofenol) – 2,6-dichlorofenolindofenol
DDD	(daily recommended dose) – denní doporučená dávka
DHA	(dehydroascorbic acid) – dehydroaskorbová kyselina
DNPH	(2,4-dinitrophenylhydrazine) – 2,4-dinitrofenylhydrazin
DPPH	(diphenylpicrylhydrazyl) – difenylpikrylhydrazyl
ED	(electrochemical detection) – elektrochemická detekce
EDTA	(ethylenediaminetetraacetic acid) – kyselina etylendiamintetraoctová
ESI	(electrospray ionization) – ionizace elektrosprejem
EPR	(electron paramagnetic resonance) – elektronová paramagnetická resonance
FAB	(fast atom bombardment) – ionizace ostřelováním vzorků rychlými atomy
FD	(fluorescence detection) – fluorescenční detekce
FCH	(faculty of chemistry) – fakulta chemická
FIA	(flow injection analysis) – průtoková injekční analýza
FRAP	(ferric reducing antioxidant potential) – metoda stanovení TAC
GC	(gas chromatography) – plynová chromatografie
HILIC	(hydrophilic interaction liquid chromatography) – kapalinová chromatografie založená na hydrofilních interakcích
HPLC	(high-performance liquid chromatography) – vysokoúčinná kapalinová chromatografie
MALDI	(matrix-assisted laser desorption/ionization) – desorpce/ionizace laserem za přítomnosti matrice
MEKC	(micellar electrokinetic chromatography) – micelární elektrokinetické chromatografie
MS	(mass spectrometry) – hmotnostní spektrometrie

NMR	(nuclear magnetic resonance) – nukleární magnetická resonance
ODS	(octadecyl silica gel) – oktadecylovaný silikagel
ORAC	(oxygen radical absorbance capacity) - metoda stanovení TAC
PC	(paper chromatography) – papírová chromatografie
PS/DVB	(poly(styrene-divinylbenzene) – poly(styren-divinylbenzen)
RPC	(reversed phase chromatography) – chromatografie s opačným sledem fází
SDS	(sodium dodecyl sulfate) – dodecylsírán sodný
TAC	(total antioxidant capacity) – celková antioxidační kapacita
TBA-MDA	(thiobarbituric acid-malondialdehyde) – kyselina thiobarbiturová-malondialdehyd
TEAC	(trolox equivalent antioxidant capacity) – metoda stanovení TAC
TLC	(thin layer chromatography) – tenkovrstvá chromatografie
TOF	(time of flight) – průletový analyzátor
UV	(ultraviolet radiation) – ultrafialové záření
VIS	(visible radiation) – viditelné záření
VUT	(university of technology) – Vysoké učení technické

8 SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha 1: Naměřené hodnoty absorbancí ředěných vzorků potřebné pro výpočet koncentrace monomerního pigmentu ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$) pH diferenciální metodou
- Příloha 2: Hodnoty koncentrace monomerního pigmentu ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$) a přepočtené hodnoty koncentrace monomerního pigmentu na 100 g čerstvých plodů stanovené pH diferenciální metodou
- Příloha 3: Vypočtené hodnoty sytosti barvy a polymerní barvy potřebné pro výpočet procentuálního zastupení polymerní barvy pH diferenciální metodou
- Příloha 4: Hodnoty koncentrace kyseliny askorbové ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$) a přepočtené hodnoty obsahu vitamínu C na 100 g čerstvých plodů
- Příloha 5: Naměřené hodnoty absorbancí extraktů potřebné pro výpočet zhášecí aktivity (%)

9 PŘÍLOHY

Příloha 1: Naměřené hodnoty absorbancí ředěných vzorků potřebné pro výpočet koncentrace monomerního pigmentu ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$) pH diferenciální metodou

Odrůda	Absorbance ředěných vzorků		
	Detvan Želešice	0,626	0,631
Detvan Padochov	0,653	0,637	0,646
Holandský červený	0,396	0,380	0,389
Rubigo Želešice	0,541	0,536	0,542
Rubigo Lysice	0,774	0,769	0,773
Losan	0,606	0,625	0,616
Tatran	0,258	0,259	0,256
Vitan	0,736	0,745	0,740
Neznámý vzorek 1	0,558	0,590	0,610
Neznámý vzorek 2	0,472	0,505	0,427

Příloha 2: Hodnoty koncentrace monomerního pigmentu ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$) a přepočtené hodnoty koncentrace monomerního pigmentu na 100 g čerstvých plodů stanovené pH diferenciální metodou

Odrůda	Koncentrace monomerního pigmentu c_{MP} ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)			Celkový obsah monomerního pigmentu c ($\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$)		
	Detvan Želešice	31,36	31,61	31,41	1,67	1,68
Detvan Padochov	32,71	31,91	32,36	1,67	1,63	1,66
Holandský červený	19,84	19,04	19,47	1,01	0,97	0,99
Rubigo Želešice	27,10	26,85	27,15	1,31	1,30	1,32
Rubigo Lysice	38,77	38,52	38,72	2,57	2,55	2,56
Losan	379,48	391,38	385,74	20,58	21,23	20,92
Tatran	12,92	12,98	12,82	0,53	0,53	0,53
Vitan	36,87	37,32	36,72	2,13	2,15	2,14
Neznámý vzorek 1	1118,16	1182,28	1222,36	27,35	28,92	29,90
Neznámý vzorek 2	945,82	1011,95	855,65	27,41	29,33	24,80

Příloha 3: Vypočtené hodnoty sytosti barvy a polymerní barvy potřebné pro výpočet procentuálního zastupení polymerní barvy pH diferenciální metodou

Odrůda	Sytost barvy			Polymerní barva		
Detvan Želešice	1,347	1,343	1,339	0,159	0,158	0,159
Detvan Padochov	1,035	1,020	1,048	0,096	0,099	0,096
Holandský červený	0,973	0,975	0,951	0,349	0,351	0,345
Rubigo Želešice	1,194	1,188	1,191	0,186	0,159	0,174
Rubigo Lysice	1,602	1,605	1,603	0,234	0,240	0,246
Losan	1,011	1,032	1,038	0,057	0,09	0,063
Tatran	0,663	0,627	0,645	0,126	0,117	0,121
Vitan	1,578	1,566	1,551	0,216	0,228	0,213
Neznámý vzorek 1	0,510	0,480	0,519	0,060	0,084	0,042
Neznámý vzorek 2	0,246	0,36	0,318	0,042	0,048	0,039

Příloha 4: Hodnoty koncentrace kyseliny askorbové ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$) a přepočtené hodnoty obsahu vitamínu C na 100 g čerstvých plodů

Odrůda	Koncentrace kyseliny askorbové v daném extraktu ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)			Obsah vitamínu C ($\text{mg} \cdot 100 \text{g}^{-1}$)		
Červený rybíz						
Detvan Želešice	32,88	29,70	26,26	38,83	34,01	30,71
Detvan Lysice	21,74	21,79	22,46	26,94	26,27	26,36
Detvan Padochov	18,10	16,87	20,03	22,13	20,44	24,61
Holandský červený	24,12	17,53	17,45	29,06	21,63	20,60
Rubigo Želešice	39,19	31,55	32,02	46,84	37,39	39,60
Rubigo Lysice	27,40	27,93	29,88	31,98	33,44	36,68
Losan	37,84	36,69	37,11	46,42	43,40	45,79
Tatran	26,14	22,72	24,85	31,78	26,33	29,58
Vitan	36,23	37,22	39,55	44,55	43,16	47,30
Rovada	13,98	13,04	12,39	23,14	22,87	20,18
Bílý rybíz						
Blanka	23,67	19,49	21,06	28,57	23,21	25,36
Primus	35,80	36,57	23,92	42,84	41,21	29,50
Jantar	70,71	56,80	59,66	82,95	69,24	74,44
Orion	17,71	20,62	25,49	20,90	25,44	30,90
Viktorie	17,25	18,74	30,59	19,75	22,72	36,61
Neznámý vzorek 3	18,54	17,71	16,41	21,68	22,06	19,00
Černý rybíz						
Neznámý vzorek 1	24,47	20,52	25,43	152,95	121,80	145,76
Neznámý vzorek 2	37,50	33,95	37,42	167,09	151,95	175,09

Příloha 5: Naměřené hodnoty absorbancí extraktů potřebné pro výpočet zhášecí aktivity (%)

Odrůda bílého rybízu	Absorbance A (v čase 70 s)		
Blanka	0,348	0,352	0,360
Primus	0,320	0,329	0,327
Jantar	0,216	0,221	0,235
Orion	0,352	0,356	0,360
Viktorie	0,321	0,322	0,363
Neznámý vzorek 3	0,277	0,272	0,275