

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Brno, 2018

Bc. Tereza Lošková



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**EXTRAKCE ANTHOKYANOVÝCH BARVIV Z
BEZINKOVÝCH VÝLISKŮ**

EXTRACTION OF ANTHOCYANIN PIGMENTS FROM ELDERBERRIES POMACE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Tereza Lošková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.

BRNO 2018

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1223/2017
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Tereza Lošková**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.**
Akademický rok: 2017/18

Název diplomové práce:

Extrakce anthokyanových barviv z bezinkových výlisků

Zadání diplomové práce:

Teoretická část:

- 1) Stručná charakteristika rostlinného druhu *Sambucus nigra*
- 2) Anthokyanová barviva obsažená v bezinkách, jejich vlastnosti a využití v potravinářství
- 3) Postupy odpařování a zahušťování

Experimentální část:

- 1) Extrakce průmyslových bezinkových výlisků
- 2) Zakoncentrování získaného extraktu
- 3) Stanovení vlastností výsledného produktu
- 4) Vyhodnocení a diskuse získaných výsledků

Termín odevzdání diplomové práce: 7.5.2018

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

Bc. Tereza Lošková
student(ka)

RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá výrobou koncentráту z extraktu bezových slupek (bez černý, *Sambucus nigra* L.) a stanovením základních chemických charakteristik v tomto produktu.

Teoretická část pojednává o botanické charakteristice bezu černého a jeho plodů. Dále je zde shrnuta charakteristika fenolických látek, především anthokyanů, využití těchto přírodních barviv v potravinářství a možnost jejich extrakce z bezových slupek a následná výroba koncentráту. Dále jsou popsány metody stanovení anthokyanových barviv a fenolických látek.

V experimentální části byl nejprve optimalizován postup výroby extraktu z bezových slupek, které po vylisování šťávy obsahují stále dostatečné množství anthokyanových barviv. Jako nejvhodnější postup byla zvolena příprava extraktu bezových slupek pomocí rozpouštědla o složení 1:1 ethanol/voda (V/V) v poměru výlisky/rozpouštědlo 1:2 (m/V).

Následně byl připravený extrakt zahušťován. Během koncentrace na vakuové odparce byla pozorována degradace barviv. Degradace byla nižší při použití nižších teplot odpařování. Výsledný koncentrát byl získán zakoncentrováním extraktu na vakuové odparce při 45 °C po dobu 15 minut. Tento produkt měl 7krát menší objem než výchozí extrakt.

Finální koncentrát byl charakterizován stanovením jeho vybraných chemických vlastností. Metodou HPLC byly stanoveny majoritní pigmenty: kyanidin-3-sambubiosid (C3S) a kyanidin-3-glukosid (C3G). Jejich celkový obsah byl 34,9 g·l⁻¹ koncentráту. Celkový obsah anthokyanů v koncentráту stanovený pH-diferenciální metodou jako ekvivalent kyanidu-3-glukosidu činil 7,1 g·l⁻¹. Dále byl Folin-Ciocalteuovou metodou stanoven obsah fenolických látek: 27,1 g·l⁻¹, jako ekvivalent kyseliny gallové. Pomocí elektronové paramagnetické rezonance byla pozorována zvyšující se antioxidační aktivita bezového extraktu při zvyšující koncentraci anthokyanů. Celkem až 42 různých aromatických látek bylo identifikováno metodou GC-MS-SPME v bezových výliscích a v extraktu a koncentráту z těchto výlisků.

KLÍČOVÁ SLOVA

Výlisky bezu černého (*Sambucus nigra* L.), extrakce barviv, celkové anthokyany, celkové fenolické látky, aromaticky aktivní látky, celková antioxidační aktivita

ABSTRACT

This Diploma thesis deals with the production of the concentrate from the Elderberry marc extract (*Sambucus nigra* L.). The basic chemical characteristics in this concentrate were determined.

The theoretical part of the thesis deal with the botanic characteristic of the Elderberry and its berries. The characteristic of the phenolic compounds, mainly anhocyanins was summarized. The use of the anthocyanin pigments in the food industry, the possibilities of their extraction and the concentrate production was discussed. Thereafter the methods of the anthocyanin content and the phenolic content determination were described.

In the experimental part of study, the production of the anthocyanin rich extract from Elderberry marc was optimized. The extraction of the marc by the 1:1 ethanol/water (V/V) solvent with the ratio marc/solvent 1:2 (w/V) showed the most convenient.

The production of the concentrate followed. During the concentration on the rotary evaporator the pigment degradation was investigated. The degradation decreased with the decrease of the temperature. The final concentrate was prepared from the extract on the rotary evaporator by 45 °C for 15 minutes. This product had the 7times lower volume compared to the initial extract.

In the final concentrate come of the chemical characteristic were determined. By liquid chromatography (HPLC) the major pigments cyanidin-3-sambubiosid and cyanidin-3-glucosid were determined. Their total content was determined to 34,9 g·l⁻¹. The total anthocyanin content was determined by pH differential method to 7,1 g·l⁻¹ (expressed as cyanidin-3-glucoside equivalent). The total phenolic content was determined to 27,1 g·l⁻¹ (expressed as gallic acid equivalent) by Folin-Ciocalteu method. By electron paramagnetic resonance the increase in antioxidant activity with the increase in concentration was found. Up to 42 aromatic compounds was determined in Elderberry marc, its extract and the final concentrate.

KEY WORDS

Elderberry pomace (*Sambucus nigra* L.), extraction of pigments, total anthocyanins, total phenolics, aromatic active compounds, total antioxidant activity.

LOŠKOVÁ, T. *Extrakce anthokyanových barviv z bezinkových výlisků*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. XY 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

Chtěla bych poděkovat RNDr. Mileně Vespalcové, Ph.D., za odborné vedení mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Jaromírovi Pořízkovi, Ph.D. a Ing. Evě Vítové, Ph.D. za pomoc při práci v laboratoři.

Také bych chtěla poděkovat celé mé úžasné rodině, která mě podporovala a věřila, že to jednou dokážu.

OBSAH

1	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
1.1	Bez černý.....	9
1.1.1	Taxonomické zařazení bezu černého [3].....	9
1.1.2	Výskyt bezu černého	9
1.1.3	Pěstování šlechtěných odrůd bezu černého	9
1.1.4	Využití bezu černého v potravinářství.....	10
1.1.5	Koncentrování ovocných šťáv.....	11
1.1.6	Slupky jako vedlejší produkt a jejich využití	12
1.1.7	Extrakce.....	12
1.1.8	Chemické složení a obsah účinných látek v bezu černém.....	12
1.2	Fenolické látky	13
1.2.1	Fenolické kyseliny.....	13
1.2.2	Flavonoidy.....	13
1.3	Anthokyanová barviva	14
1.3.1	Funkce v rostlinách	14
1.3.2	Využití v potravinářském průmyslu	15
1.3.3	Stabilita anthokyanových barviv	15
1.3.4	Obsah anthokyanových barviv v bezu černém.....	15
1.3.5	Antioxidační aktivita anthokyanových barviv	16
1.4	Aromaticky aktivní látky.....	17
1.5	Metody stanovení chemických parametrů extraktu a koncentrátu.....	17
1.5.1	pH-diferenciální metoda stanovení celkových anthokyanů	17
1.5.2	Stanovení celkových fenolických látek podle Folin-Ciocalteua	18
1.5.3	Chromatografické techniky	18
1.5.4	Elektronová paramagnetická rezonance (EPR).....	20
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	21
2.1	Původ rostlinného materiálu a jeho skladování.....	21
2.2	Laboratorní vybavení	21
2.2.1	Přístroje	21
2.2.2	Pomůcky.....	21
2.2.3	Chemikálie a plyny.....	22
2.3	Příprava extraktů z bezových výlisků	22

2.4	Příprava koncentrátů extraktů z bezových výlisků.....	22
2.5	Stanovení celkových anthokyanových barviv pH-diferenciální metodou	23
2.5.1	Příprava roztoků	23
2.5.2	Příprava vzorků a samotné měření	23
2.6	Stanovení celkových fenolických látek metodou podle Folin-Ciocalteua	24
2.6.1	Příprava roztoků	24
2.6.2	Příprava vzorků a vlastní měření.....	24
2.7	Stanovení antioxidační aktivity pomocí EPR.....	25
2.7.1	Příprava roztoku radikálu, vzorků a vlastní měření	25
2.8	Analýza složení kondenzátu pro účely recyklace extrakčního činidla.....	25
2.9	Stanovení anthokyanových barviv za použití HPLC	25
2.9.1	Příprava mobilních fází (MF).....	25
2.9.2	HPLC analýza vzorků a kalibrační křivka	26
2.10	Stanovení aromaticky aktivních látek pomocí GC-MS.....	27
2.10.1	Příprava vzorků a GC-MS analýza.....	27
2.11	Statistické zpracování naměřených dat	28
3	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	29
3.1	Optimalizace poměru materiálu a rozpouštědla	29
3.2	Stanovení antioxidační aktivity bezového extraktu	30
3.3	Recyklace rozpouštědla.....	31
3.4	Degradace barviv při přípravě koncentráту na vakuové odparce	32
3.5	Stanovení vlastností výsledného produktu	33
3.5.1	HPLC analýza anthokyanových barviv	33
3.5.2	Stanovení celkového obsahu monomerního pigmentu.....	35
3.5.3	Stanovení celkového obsahu fenolických látek	36
3.5.4	Stanovení aromaticky aktivních látek pomocí GC-MS.....	36
4	ZÁVĚR.....	40
5	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	42
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	48
7	SEZNAM PŘÍLOH	49
8	PŘÍLOHY	50

ÚVOD

Plody bezu černého (*Sambucus nigra* L.) jsou bohatým zdrojem fenolických látek, kterým je dnes v mnoha studiích věnována pozornost. Jedním z důvodů je, že jsou těmto látkám přisuzovány antioxidační vlastnosti. Mezi fenolické látky patří, mimo jiné, skupina anthokyanových pigmentů. Tyto látky jsou zodpovědné za černo-fialové zbarvení bezových plodů. Anthokyany jsou v potravinářském průmyslu využívány jako barviva. Díky svému přírodnímu původu jsou tak často preferována spotřebiteli, před barvivy syntetickými. Dalším faktorem je pozitivní vliv anthokyanových barviv na lidské zdraví.

Bezová šťáva, využívaná jako součást potravin, především pro svoji vysokou barvivost, je získávána z bezinek lisováním. Jako vedlejší produkt této výroby tak vznikají výlisky, které stále obsahují velký podíl barviv. Proto je v zájmu producentů šťávy proměnit tento vedlejší produkt ve využitelný zdroj přírodního barviva. Toho lze docílit extrakcí vhodnými potravinářskými rozpouštědly.

Cílem této práce bylo vytvořit postup pro účinnou extrakci anthokyanů z bezových slupek a pro následnou výrobu koncentráту pomocí vakuové odparky.

Náplň této práce byla formována na základě spolupráce se zadavatelem a postupy byly uzpůsobeny jeho požadavkům a možnostem.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Bez černý

Bez černý (*Sambucus nigra* L.), je opadavý keř a vzácněji strom vyrůstající do výšky až 6 metrů. Větve mají šedozelenou až šedohnědou rozpraskanou kůru a uvnitř bílou dřev. Z větviček bezu vyrůstají složené lichozpeřené listy se dvěma či třemi jařmy. Jařma tvoří dvojice podlouhle vejčitých lístků, jež jsou na okraji nestejně pilovité a 5–10 cm dlouhé. Drobné smetanově bílé květy se žlutými prašníky tvoří bohaté ploché vrcholíky. Každý keř může ročně vyplodit až 15 kg plodů, které rostou v trsech a řadíme je mezi bobulovité ovoce. Jsou to kulaté peckovičky rozměru 6–8 mm, která obsahující tři semena. Zralé jsou černofialové až černé s purpurově červenou šťavnatou dužinou. Období sklizně plodů nastává od poloviny srpna do poloviny září. [1] [2]

1.1.1 Taxonomické zařazení bezu černého [3]

Říše:	rostliny (Plantae)
Podříše:	cévnaté rostliny (Tracheobiota)
Nadoddělení:	semenné rostliny (Spermatophyta)
Oddělení:	rostliny krytosemenné (Magnoliophyta)
Třída:	nižší dvouděložné rostliny (Magnoliopsida)
Podtřída:	Asteridae
Řád:	štetkotvaré (Dipsacales)
Čeleď:	zimolezovité (Caprifoliaceae)
Rod:	bez (<i>Sambucus</i> L.)
Druh:	bez černý (<i>Sambucus nigra</i> L.)

1.1.2 Výskyt bezu černého

Černý bez má svůj původ v Evropě. Postupem času se však rozšířil po celém světě a jeho dnešní území výskytu je rozsáhlé a rozprostírá se mimo Evropu také v Austrálii, Jižní Americe, v západní a střední Asii či v Severní Africe. [4]

Bez černý přirozeně roste na stráních, mezích, rumištích, podél cest a potoků, na okrajích lesů, v křovinách a parcích. Je také velmi hojný u zdí, plotů a stavení, dokonce i na skládkách a kompostech či podél sloupů elektrického vedení. Je nenáročný na půdní prostředí, mimo zastíněných stanovišť se mu daří téměř všude. Snáší znečištěné ovzduší a běžně roste i na chudých a devastovaných půdách a dobře snáší vyšší obsah dusíku v půdě, který mu dokonce prospívá. Přes to vše jsou však ideální podmínky pro jeho růst kypré a vlhké humózní půdy. [2] [5]

1.1.3 Pěstování šlechtěných odrůd bezu černého

Zvyšující se zájem o potravinářské využití bezu černého vedl na konci 20. století k počátkům kulturního pěstování této rostliny. Do té doby byly běžným zdrojem pro výrobu šťáv bobule z volně rostoucích keřů. Největšími evropskými producenty plodů vyšlechtěných odrůd jsou dnes Rakousko, Německo, Dánsko, Nizozemí a Švédsko. Bezové plantáže lze ale nalézt také ve Švýcarsku, Itálii, Polsku, Velké Británii či v severním Portugalsku. [4]

Bez černý, jemuž je věnována tato práce, má mnoho kulturních odrůd. Je to např. Albida, Allesø, Aurea, Bohatka, Dana, Haschberg, Heidegg 13, Korsør, Mammut, Pregarten, Riese aus Voßloch, Sambo, Sambu, Samdal, Sampo, Samyl a Weihenstephan. Přibližně před deseti lety vznikly první bezové sady také v ČR.

1.1.4 Využití bezu černého v potravinářství

Po sklizni mohou být plody bezu konzumovány v čerstvé nebo sušené formě, zamraženy pro výrobu zmrzlin či zpracovávány za účelem produkce šťáv, nektarů, vín, džemů, marmelád, sirupů, likérů, čaje a kompotu. Jelikož je bezová šťáva významným zdrojem barviv, je také možné ji použít pro barvení džusů z jiného ovoce a k barvení dalších výrobků, nejčastěji cukrovinek.



Obrázek 1: Plody bezu černého [6]

Drobné plody, jako i bez černý, mají krátké období sklizně, po kterém mohou být pouze několik týdnů skladovány v mraženém stavu. Proto je nezbytné jejich další zpracování pro prodloužení trvanlivosti. [7]

Jak uvádí Maskan a kol. v článku z roku 2002, jednou z nejvýznamnějších metod konzervace potravin je tepelné zpracování, které vede k inaktivaci enzymů, nežádoucích mikroorganismů a snižuje vodní aktivitu v potravině. Toho se využívá při zpracovávání šťávních koncentrátů, které jsou produkovány ze šťáv jejich zahuštěním neboli koncentrací. [8]

Ta musí být provedena šetrně, bez větších změn v obsahu cukrů, minerálů a vitamínů. Dalším důležitým aspektem úspěšného zpracování ovoce je zachování jeho barvy, jež je jednou ze základních sensorických vlastností určujících kvalitu produktu. K nežádoucím

změněnám zbarvení vede jak degradace přítomných barviv, tak například neenzymatické hnědnutí. [7]

1.1.5 Koncentrování ovocných šťáv

Primárním krokem k zakoncentrování vylisovaných ovocných šťáv je snížení obsahu vody. Mezi způsoby odstranění vody z materiálů patří jak konvenční zahřívání, tak například membránová koncentrace či mikrovlnný záhřev. Membránová koncentrace, i přes svoji šetrnost, není běžně využívána. Důvodem jsou vysoké náklady a limity v obsahu získaného produktu. Mikrovlnné záření zahřívá materiál přímo, bez kontaktu s horkým povrchem a čas zahřívání je u této techniky kratší než u konvenčního zahřívání. Konvenční zahřívání je poté nejméně šetrnou, avšak jednoduchou technikou. [7]

Rotační vakuová odparka patří mezi způsoby koncentrace konvenčním zahříváním. Pracuje za sníženého tlaku a zvýšené teploty. Jedná se o techniku jednoduše ovladatelnou a dostupnou. Fazaeli a kol. (2013) provedli porovnání vakuové odparky a mikrovlnného záření a jejich vlivu na materiál při produkci koncentráту. Došli k závěru, že míra degradace anthokyanů byla při použití vakuové odparky vyšší než při použití mikrovlnného záření. Zároveň zjistili zvyšující se degradaci barviv se zvyšujícím se použitým tlakem a teplotou. [7] Šetrný postup pro získání koncentráту z extraktů či šťáv je tak stále otázkou optimalizace a je jí věnována pozornost v experimentální části této práce.



Obrázek 2: Rotační vakuová odparka

1.1.6 Slupky jako vedlejší produkt a jejich využití

Průmyslová výroba šťáv sestává z celé série kroků, kdy jedním z nich je proces lisování. Pro lisování plodů jsou využívány hydraulické či pneumatické lisy různých rozměrů, v závislosti na velikosti provozu. [9] [10]

Vedlejším produktem lisování jsou slupky plodů neboli výlisky. Díky látkám v nich obsaženým se dnes slupky stávají cennou druhotnou surovinou, kterou je možné využít a recyklovat. Mimo další způsoby využití, například jako adsorbenty kovů z odpadních vod, je možné výlisky využít jako zdroj barviv a dalších fenolických látek pro potravinářské účely. Látky mohou být ze slupek získávány extrakcí do rozpouštědla a následným zahuštěním takového extraktu lze získat koncentrát. Pokud je recyklace vedlejších surovin součástí výroby, lze produkty této recyklace kombinovat s primárními produkty a získat tak nový finální produkt. Je možné koncentrát extraktu z výlisků přidávat ke šťavnímu koncentrátu a zvýšit tak jeho barevnost a celkový obsah zdraví prospěšných látek. [9] [10] Polášková a kol. uvádí, že převládající množství barviv (až do 90 %) je obsaženo ve slupce bezu, oproti dužině. [11]

1.1.7 Extrakce

Extrakce je fyzikální proces, při kterém dochází k přechodu extrahované látky z jedné fáze do druhé. Může se jednat o extrakci kapalina-kapalina nebo kapalina-pevná látka, jako v případě extrakce anthokyanů z rostlinného materiálu. Navzdory novým technologiím, jako je superkritická fluidní extrakce, extrakce s použitím ultrazvuku či mikrovlnného záření, nebo zrychlená extrakce rozpouštědlem, klasická macerace je stále jednou z nejjednodušších metod získání bioaktivních látek z rostlinných materiálů. [12] [13]

Extrakce anthokyanů je účinná za použití organických rozpouštědel. Ethanol je, díky své ne-toxicitě a nízké ceně, nejvhodnějším rozpouštědlem z hlediska využití extraktů v potravinářství. [14] Nalezení správných extrakčních podmínek pro extrakci anthokyanů je velmi důležitým krokem v celém procesu. Jedná se o poměr mezi materiálem a rozpouštědlem, o koncentraci samotného rozpouštědla a teplotu extrakce. Všechny tyto parametry ovlivňují rozpustnost extrahovaných látek. [15]

Cacace a Mazza (2003) jako nejvýznamnější ze všech studovaných faktorů na výtěžky anthokyanů uvádějí právě poměr množství rozpouštědla a extrahovaného materiálu. Se zvyšujícím se poměrem rozpouštědla ku materiálu se zvyšují výtěžky anthokyanů i fenolů. [15] Se stejným závěrem přichází i Pompeu a kol. (2009). [16]

Cacace a Mazza (2003) se dále věnují vlivu koncentrace rozpouštědla. Zjistili, že výtěžky fenolických látek i anthokyanů se zvyšují až do koncentrace ethanolu 67 %, ale následně jsou nižší při koncentraci ethanolu 95 %, kdy se snižuje jejich difusní koeficient. [15] Nour a kol. (2013) uvádí rozdílné chování pro fenolické látky a anthokyanů. V případě anthokyanů se výtěžky zvyšují až do koncentrace ethanolu 60 % a klesají při 96 %. U fenolických látek výtěžek nepatrně stoupá až do koncentrace 96 %. [13]

1.1.8 Chemické složení a obsah účinných látek v bezu černém

Plody bezu obsahují 18,4 % sacharidů, přičemž cukry, především glukosa a fruktosa, představují 6,8–11,5 %. Dále plody obsahují třísloviny (3 %), proteiny (2,7–2,9 %),

flavonoidy, anthokyaniny (0,2–1 %), kyanogenní glykosidy (sambunigrin), organické kyseliny, silice (0,01 %), vitamíny skupiny B, skupiny A, tokoferoly a vitamín C (0,006–0,03 %). Dále obsahují minerální látky (0,99 %) tohoto složení: K, Ca, Fe, Mg, P, Na, Zn, Cu, Mn, Se, Cr, Ni a Cd. [17] [18]

Květy obsahují proteiny (2,4 %), silice (0,03–0,14 %), flavonoidy (1,8 %; rutin, isokvarcetin, hyperosid), fenolkarboxylové kyseliny (chlorogenovou, p-kumarovou, kávovou, ferulovou), triterpeny (alfa-amyrin a beta-amyrin, ursolovou a oleanovou kyselinu), třísloviny a sliz. Semena plodů obsahují nenasycené mastné kyseliny, jmenovitě linolenovou, linolovou a olejovou. [17]

1.2 Fenolické látky

Fenolické látky jsou sekundární metabolity rostlin, odvozené od aminokyselin fenylalaninu nebo tyrosinu, ze kterých vznikají fenylpropanoidovou dráhou. Jsou to látky téměř všudypřítomné v potravinách rostlinného původu a zahrnují široké spektrum molekul. [19]

Obecně obsahují jedno nebo více aromatických jader, na nichž je navázána nejméně jedna hydroxylová skupina. Dále může být vázáno různé množství glykosylových a methylových skupin. Struktury s více aromatickými jádry nazýváme polyfenoly. Fenolické látky obsažené v bobulovitém ovoci v základu rozdělujeme na flavonoidy, fenolické kyseliny, tanniny a stilbeny. [20]

1.2.1 Fenolické kyseliny

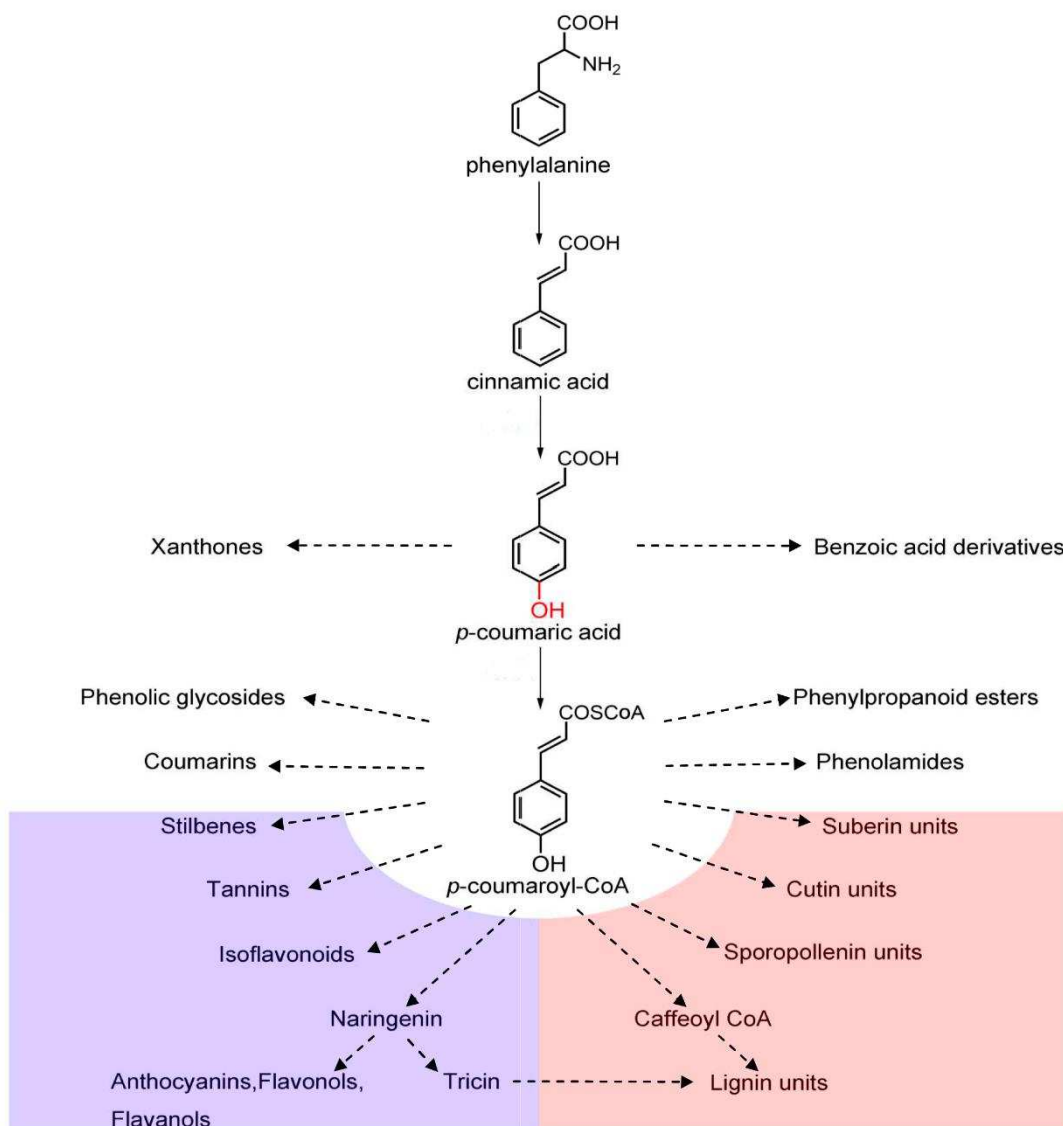
Fenolické kyseliny je možné rozdělit mezi deriváty kyseliny skořicové a kyseliny benzoové. Látky odvozené od kyseliny skořicové bývají obvykle esterifikovány, zatímco látky odvozené od kyseliny benzoové bývají většinou glykosylovány. Volné fenolické kyseliny se jen výjimečně vyskytují v ovoci v množství vyšším než 5 %. [20]

V bobulovitých plodech se ze skupiny hydroxyderivátů kyseliny skořicové vyskytují nejčastěji kyselina ferulová, kávová, p-kumarová a chlorogenová. Nejčastějšími deriváty kyseliny benzoové v těchto plodech jsou potom kyselina gallová, salicylová, p-hydroxybenzoová a ellagová. [20]

1.2.2 Flavonoidy

Flavonoidy jsou rozsáhlou skupinou rostlinných fenolů, jenž zahrnují tisíce struktur. Základní strukturu tvoří flavan, který obsahuje dva aromatické kruhy, propojené kyslíkatým heterocyklem se třemi uhlíkatými atomy. Podle stupně oxidace centrálního C₃ řetězce je rozeznáváno sedm základních struktur flavonoidů: anthokyanidiny, flavony, flavanony, flavonoly, flavanonoly, flavan-3-oly (katechiny) a isoflavony. [21]

Základní strukturu všech anthokyanidinů tvoří flavyliový (2-fenylbenzopyryliový) kation. Z hlediska chemie potravin má význam šest hlavních anthokyanidinů s hydroxylovou skupinou v poloze C-3. Jsou to kyanidin, pelargonidin, peonidin, delphinidin, petunidin a malvidin. [19] Zbarvení jednotlivých anthokyanidinů se liší podle počtu navázaných hydroxylových skupin na aromatickém kruhu B. Se zvyšujícím se počtem hydroxylových skupin se barva molekuly posunuje na škále od oranžové k modré. [22] Anthokyaniny neboli anthokyanová barviva jsou O-glykosidy anthokyanidinů. [23]



Obrázek 3: fenylpropanoidová dráha [24]

1.3 Anthokyanová barviva

Anthokyany jsou O-glykosidy anthokyanidinů a obsahují navázanu jednu, dvě nebo tři cukerné jednotky. Nejčastěji jsou to glukosa, galaktosa, rutinosa, arabinosa, rhamnosa, sambubiosa a sophorosa. [25]

1.3.1 Funkce v rostlinách

Anthokyany jsou vůbec nejrozšířenější skupinou rostlinných barviv. Hrají roli při vábení opylovačů a roznašečů semen a účastní se na obranných mechanismech rostliny proti biotickým a abiotickým stresovým faktorům. [26] Jsou to ve vodě rozpustné červené, purpurové, nachové a modré pigmenty, které udávají barvu květů a plodů mnoha rostlin. Nacházejí se ve vakuolách rostlinných buněk ve formě různě velikých granulí, zatímco v buněčných stěnách a ostatních buněčných organelách rostlin nejsou obsažené prakticky vůbec. [26]

1.3.2 Využití v potravinářském průmyslu

Anthokyany jsou využívány v potravinářském průmyslu jako přírodní alternativa k syntetickým potravinářským barvivům. Nejčastěji se využívají k barvení ovocných džusů, šťáv ale i cukroviněk a jogurtů. Získávají se ze zemědělských plodin, pěstovaných přímo pro tyto účely a také z odpadů po zpracování jiných plodin. Jelikož profil obsažených barviv je pro různé plody charakteristický, je využíván také při odhalování pančování ovocných šťáv a vína. Zatímco některé plody, jako červený rybíz nebo černý bez, obsahují pouze deriváty jednoho druhu anthokyanu, jiné plody, jako brusinka, borůvka a černý rybíz obsahují široké spektrum těchto pigmentů. V Evropské Unii se všechna anthokyanová barviva vyskytují ve výrobcích pod označením aditiva E163. [27] [10]

1.3.3 Stabilita anthokyanových barviv

Využitelnost anthokyanových barviv je limitována některými jejich vlastnostmi. Jsou to především nestabilita při vysokých teplotách, v přítomnosti světla a kyslíku. Dále je jejich použití omezeno na kyselé potraviny do pH 4,0, nad nímž jsou již barevně nestabilní. [15] [28]

Inami a kol. provedli studii teplotní a světelné stability anthokyanů v modelových nápojích připravených z bezu černého. Po 30 dnech skladování v temnu při teplotě 50 °C koncentrace pigmentů klesla na 50 %. Při sledování světelné stability byly nápoje vystaveny přímým slunečním paprskům a koncentrace pigmentů poklesla na 20 % po vystavení záření o celkové hodnotě 60 MJ·m⁻². Provedli současně porovnání se stabilitou nápojů z bezu kanadského, které se ukázaly být proti vlivu tepla i světla stabilnější. Důvodem může být struktura odlišných anthokyanů nacházejících se v těchto dvou druzích. [29]

Fazaeli a kol. ve své studii z roku 2013 sledovali degradaci anthokyanů šťávy z moruše černé během její koncentrace pomocí rotační vakuové odparky. Výsledkem byla zvyšující se degradace pigmentů při zvyšující se teplotě a tlaku. Nejvýraznější degradace probíhala při odpařování za atmosférického tlaku (100 kPa). [7]

Stabilita anthokyanových barviv v bezových extraktech při skladování v chladu byla pozorována ve studii z roku 2017. Vyplývá z ní, že degradace pigmentů při skladování po dobu 14 dnů při 2 °C nebyla významná. [30]

1.3.4 Obsah anthokyanových barviv v bezu černém

Bobule bezu černého jsou bohatým zdrojem anthokyanových barviv i nebarevných fenolických látek, dokonce bohatším než některé další druhy ovoce, jako je černý rybíz, aronie nebo slupky hroznů červené vinné révy. [31]

V plodech bezu černého je obsaženo pět anthokyanových barviv, odvozených od kyanidinu. Jejich součástí jsou cukerné jednotky glukosy, sambubiosy a rutinasy. Jsou to dva majoritní glykosidy kyanidin-3-glukosid (C3G) a kyanidin-3-sambubiosid (C3S) a tři minoritní glykosidy kyanidin-3-sambubiosid-5-glukosid (C3S5G), kyanidin-3,5-diglukosid (C3,5-DIG) a kyanidin-3-rutinosid (C3R). [19] [23]

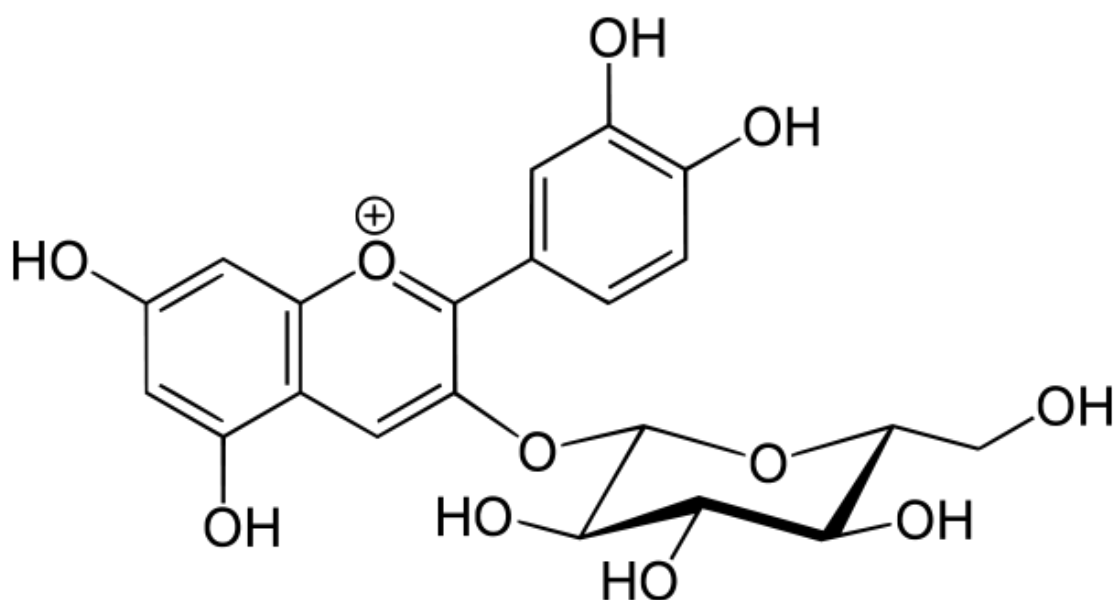
V dosavadních studiích již bylo analyzováno zastoupení jednotlivých anthokyanů v kulturních odrůdách bezu černého. Tyto hodnoty se však liší i v rámci jednoho kultivaru. Koncentrace pigmentu kyanidin-3-glukosidu v odrůdě Haschberg je dle dvou různých studií

204,6 mg CGE·100 g⁻¹ plodů [32] a 331,13 mg CGE·100 g⁻¹ plodů. [23] Jeho koncentrace v odrůdě Korsør činí dle dvou různých studií 258,6 mg CGE·100 g⁻¹ plodů [30] a 481,4 mg CGE·100 g⁻¹ plodů. [32]

Pigment kyanidin-3-rutinosid není v některých případech v plodech bezu vůbec detekován, popřípadě ve stopovém množství. [32] Veberic a kol. (2009) uvádí hodnotu 9,63 mg CGE·100 g⁻¹ plodů. [23]

Mezi odrůdami ale i v rámci jedné odrůdy se liší i druh kyanidinu, který je v plodech majoritní. Lee a Finn (2007) i Kaack a kol. (2008) uvádí u odrůdy Haschberg pigment kyanidin-3-glukosid jako majoritní a kyanidin-3-sambubiosid jako druhý nejobsáhlejší. [32] [33] Naproti tomu Veberic a kol. ve studii z roku 2008 uvádí jako majoritní pigment u odrůdy Haschberg kyanidin-3-sambubiosid. [23]

Obsah anthokyanů v plodech bezu je proměnlivý a záleží jak na jeho odrůdě, tak na konkrétní sezóně a fázi zrání ve které byly sklizeny. [33] [34] Lee a Finn (2007) mimo jiné zjistili rozdíl v množství obsažených pigmentů v závislosti na roku sklizně. [32]



Obrázek 4: Struktura pigmentu kyanidin-3-glukosidu [35]

1.3.5 Antioxidační aktivita anthokyanových barviv

Anthokyanová barviva jsou považována za látky léčivé a prospěšné lidskému zdraví a jejich konzumace za prevenci proti mnoha nemocem. Jsou jim přisuzovány zdraví prospěšné účinky jako je snížení rizik kardiovaskulárních onemocnění, antimikrobiální, protizánětlivé a protirakovinné účinky, prevence obesity a diabetu nebo zlepšování zraku. Všechny tyto účinky jsou více či méně spojovány s antioxidačními vlastnostmi těchto látek. Při procesu glykosilace anthokyanidinů, jejímž výsledkem je struktura anthokyanů, dochází současně ke změně některých vlastností. Zvyšuje se jejich stabilita a rozpustnost, ale může docházet k nepatrnému poklesu jejich antioxidační kapacity. [36] [37] [38]

Na celkovou biologickou aktivitu anthokyanů má vliv počet a pozice vázaných cukrů a druh navázané cukerné jednotky, které se od sebe liší orientací hydroxylové skupiny na pyranovém kruhu a tím i svými vlastnostmi. [36]

1.4 Aromaticky aktivní látky

Jako aromatické (vonné) látky jsou označovány látky, které působí na čichové receptory a vyvolávají dojem vůně. Pokud současně působí na chuťové receptory, jsou zároveň chuťovými látkami. Vůně potravin je často komplexním vjemem vyvolaným kombinací velkého počtu aromatických látek. Pouze ve výjimečných případech lze typickou vůni potravin spojit s vůní jediné nebo několika málo sloučenin, tzv. klíčových složek vůně. [39]

Jensen a kol. (2001) rozdělili nejvýznamnější aromatické látky bezu do šesti tříd. Za hlavní složky bezové vůně je považován beta-damascenon a dihydroedulan. Látky (*Z*)- a (*E*)-rose oxid, nerol oxid, nonanal a hotrienol jsou hlavní zástupci květinové vůně. Ovocná vůně je především přisuzována obsaženým alkoholům, aldehydům a esterům nižších karboxylových kyselin a nižších alkoholů, jako jsou: 2-metylpropan-1-ol, 2- a 3-methyl butan-1-ol, pentan-1-ol, pentanal, heptanal, oktanal a metyl- a etyl benzoát. Do skupiny čerstvých a travnatých vůní patří především: 1-hexanal, trans-2-hexenal, cis-3-hexenol, trans-2-hexenol a trans-2-oktenal. Charakteristickou vůni po houbách představují látky: 1-okten-3-ol a 1-okten-3-on. [40]

1.5 Metody stanovení chemických parametrů extraktu a koncentráту

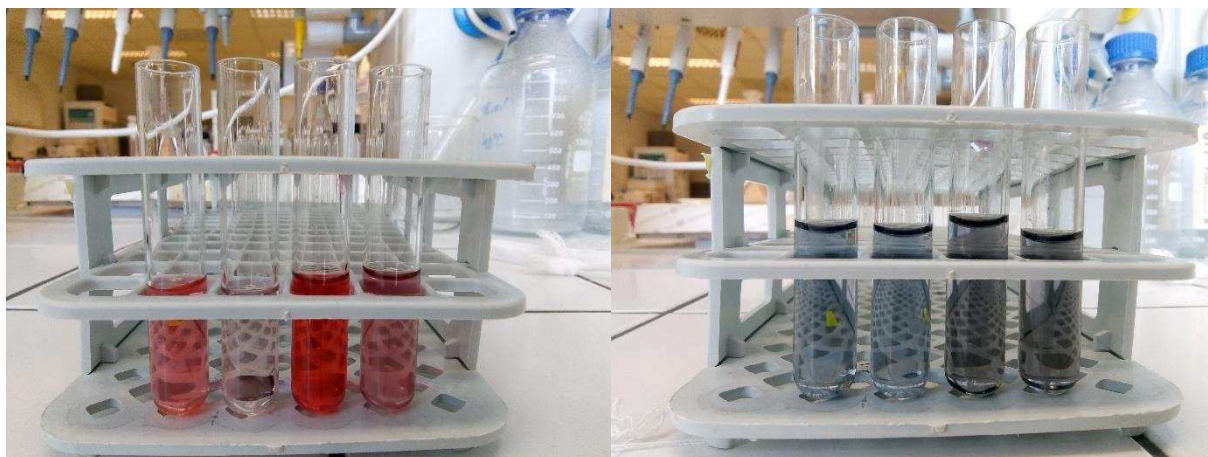
Pro stanovení obsahu anthokyanových barviv, fenolických látek, antioxidační aktivity a obsahu těkavých aromatických látek v extraktech, popřípadě jejich koncentrátech byly využity spektrometrické a chromatografické metody.

1.5.1 pH-diferenciální metoda stanovení celkových anthokyanů

Koncept stanovení celkových anthokyanů v materiálu měřením změny absorbance při dvou rozdílných hodnotách pH představili v roce 1948 Sondheimer a Kertesz. Později byla hodnota těchto pH upřesněna na 1,0 a 4,5. [41]

Monomerní anthokyanu podléhají reverzibilní změně struktury v závislosti na pH. Barevná oxoniová forma při pH 1,0 střídá bezbarvou hemiketalovou formu při pH 4,5. Právě tak lze z rozdílů absorbance při těchto dvou pH stanovit koncentraci pigmentu. Absorbance je měřena v absorpčním maximu anthokyanů, které se pohybuje mezi 510–520 nm. Vzorek je následně proměřen ještě při vlnové délce 700 nm. Důvodem je korekce chyby v měření, způsobené zákalem. Hodnoty naměřené při této vlnové délce jsou od těch prvních odečítány. Touto metodou jsou stanoveny pouze monomerní pigmenty, polymerní absorbují při obou hodnotách pH, a tedy nejsou touto metodou zjištěny. [41]

Obsah pigmentu je následně spočítán použitím naměřené absorbance při λ_{\max} , molekulové hmotnosti pigmentu a molárního absorpčního koeficientu majoritního anthokyanu v materiálu. [41]



Obrázek 5: Vzorky extraktu a koncentráty smíchané s činidly pro pH-diferenciální (nalevo) a Folin-Ciocalteuovu metodu (napravo)

1.5.2 Stanovení celkových fenolických látek podle Folin-Ciocalteua

V roce 1912 představili Folin a Denis spektrofotometrickou metodu stanovení fenolických látek. Tato byla později upravena Folinem a Ciocalteuem do dnešní podoby. Metoda je založena na reakci molybdenanu sodného a wolframanu sodného s fenolickými látkami v alkalickém prostředí. Výsledkem reakce je modře zbarvený komplex, jehož intenzitu lze měřit spektrofotometricky při vlnové délce 750 nm. [42] Folin-Ciocalteuovo činidlo se připravuje smícháním daných množství wolframanu sodného, molybdenanu sodného, koncentrované kyseliny chlorovodíkové, destilované vody, kyseliny fosforečné a síranu sodného. Principem změny zbarvení je oxidačně-redukční reakce mezi fenolickou skupinou, která je oxidována a Folin-Ciocalteuovým činidlem, kde je kov redukován.

Ve vědeckých člancích věnujících se stanovení polyfenolů touto metodou se značně liší množství a poměr použitých činidel a vzorku, stejně jako doba, po kterou je nutné nechat látky reagovat. [43]

1.5.3 Chromatografické techniky

Chromatografie je technika, jenž je v analytické chemii využívána k separaci směsí za účelem stanovení jejího složení. Principem je separace látek mezi stacionární a mobilní fází na základě afinity ke stacionární fází. Z toho vyplývá odlišná retence jednotlivých látek v systému, a tedy jejich rozdělení na frakce putující kolonou k detektoru. Pomocí chromatografie lze provádět kvalitativní i kvantitativní analýzu. Dle skupenství fází rozlišujeme dvě nejužívanější chromatografické techniky – kapalinovou a plynovou.

Výstupem z chromatografické analýzy je chromatogram, obsahující píky, kdy každý pík představuje jednu látku obsaženou ve vzorku. Doba, kterou látka stráví v systému, nazýváme retenční čas a při porovnání retenčních časů standardů a analyzovaných látek získáme informace o složení směsi. Plocha píku, při porovnání plochy píku standardu, udává informaci o množství dané látky.

Kombinaci správných podmínek pro separaci určitých látek nazýváme metoda. Při potřebě analýzy určitých vzorků je možné vytvořit si vlastní metodu stejně tak, jako použít a případně upravit metodu již ověřenou a publikovanou.

1.5.3.1 *Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)*

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie se vyvinula v 70. letech minulého století jako modernější nástupce do té doby využívaných chromatografických technik – papírové, tenkovrstvé a sloupcové. [44]

Kapalinová chromatografie je metoda sloužící k separaci látek ve vzorku mezi dvě fáze na základě odlišných fyzikálně-chemických vlastností. Stacionární fáze je umístěna v koloně ve formě sorbentu a mobilní fáze, kterou je kapalina, protéká tímto prostorem. Fáze jsou vzájemně nemísitelné. Dnes známe řadu variant provedení kapalinové chromatografie. Podle podstaty interakce analytu se stacionární fází rozlišujeme tyto základní separační mechanismy: adsorpce, rozdělování, síťový efekt, výměna iontů a afinitní chromatografie. [44] [45] Pro správný průběh analýzy je důležitá volba vhodné kolony a složení mobilní fáze, kdy se maximálně využívá interakcí mezi vzorkem, mobilní a stacionární fází.

Vysoké účinnosti této techniky bylo dosaženo zmenšením částic stacionární fáze vyplňujících kolonu na dnešní rozměry 3-5 μm . To vede k celkovému zvětšení aktivního povrchu pro separaci a zvýšení separační účinnosti. Toto se promítlo v celkovém zmenšení průměru kolon a snížení průtoku mobilní fáze, a tedy k její úspoře. Je ovšem potřeba používat vysokotlaká čerpadla, pro zajištění přiměřených průtoků a retenčních časů. [44] [46]

Pro analýzu anthokyanových barviv je vhodné použít systém HPLC vybavený detektorem s diodovým polem (DAD) pro kvantifikaci a hmotnostním spektrometrem (MS) pro identifikaci pigmentů. Absorpční maximum anthokyanů se nachází v rozmezí 510–520 nm. Využívá se kolona C_{18} a pracuje se v systému obrácených fází. [32]

1.5.3.2 *Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS)*

Plynová chromatografie je určena k dělení a stanovení látek, které jsou těkavé, a současně teplotně stabilní. Mobilní fází zde představuje nosný plyn, jenž je inertní vůči stacionární fázi. Stacionární fáze u náplňových kolon může být pevná látka, u kapilárních kolon je nanášena v tenké vrstvě přímo na vnitřní stěnu kapiláry. Využívá se zde teplotní gradient, tedy zvyšování teploty kolony v průběhu analýzy. To vede k účinnější separaci vysokovroucích látek. Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS) se v poslední době široce používá jako výkonná technika plynové chromatografie. V hmotnostním spektrometru je vzorek ionizován a vzniklé ionty jsou separovány podle hodnoty podílu jejich hmotností a náboje. Běžný MS se skládá z několika částí: vstupu, iontového zdroje, separátoru iontů, detektoru se zesilovačem a záznamovým zařízením a vakuového systému. Součástí zařízení je dělič na výstupu z kolony, který dělí proud nosného plynu do dvou větví, aby nedošlo k porušení vakua ve spektrometru. [47]

Solid-Phase Microextraction (SPME; mikroextrakce tuhou fází) je sorpčně-desorpční metoda zkoncentrování analytu. Principem je použití nadbytku vzorku vůči malému množství sorbentu. Analyt je extrahován ze vzorku pouze do dosažení rovnovážného stavu. Rovnováha se ustanovuje mezi koncentrací analytu ve vzorku, headspace prostorem nad vzorkem a polymerní vrstvou na křemenném vlákne. Metoda umožňuje provádět dva způsoby extrakce. První způsob je přímá extrakce (DI-SPME), při které dochází k ponoření vlákna přímo do vzorku. Druhým způsobem je headspace extrakce (HS-SPME), kdy je vlákno umístěno v prostoru nad vzorkem. [48]

SPME je jako alternativní technika extrakce využitelná pro GC analýzu těkavých a částečně těkavých látek v mnoha produktech, včetně ovoce a ovocných nápojů. Jedná se o rychlou, levnou a nedestruktivní kvantitativní vzorkovací techniku. Analýzu těkavých látek v bezové šťávě pomocí GC-MS provedli Jensen a kol. (2000). Z celkových více než 50 píků bylo 40 látek ve významnější koncentraci. Jednalo se především o aromatické produkty degradace mastných kyselin – alkoholy, aldehydy a ketony. [40]

1.5.4 Elektronová paramagnetická rezonance (EPR)

Elektronová paramagnetická rezonance je spektroskopická technika detekující přítomnost nepárových elektronů v systému. Je to technika měřící absorpci mikrovlnného záření odpovídajícího štěpení energetické hladiny nepárového elektronu, který je umístěn do silného magnetického pole. Spin nepárového elektronu je tak orientován ve stejném nebo opačném směru vnějšího magnetického pole. Tyto rozdílné orientace mají rozdílné hodnoty energie, které přímo úměrně odpovídají aplikovanému magnetickému poli. Tento jev označujeme jako Zeemanovo štěpení. [49]

Využití EPR pro studium antioxidačních vlastností látek bylo již dříve publikováno. [50] [51] Pro proměření antioxidační aktivity je EPR spektroskopie, na rozdíl od UV-VIS spektrometrie, využitelná pro vzorky, které nejsou průhledné a současně nehrozí interference s ostatními barevnými látkami v systému. Postup je založen na úbytku stabilních volných radikálů při interakci s látkami s antioxidačními vlastnostmi ve vzorku. Pro účely experimentů jsou nejčastěji používány stabilní radikály 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina (ABTS) a 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxyl (TEMPOL). Měření probíhá při konstantní frekvenci zdroje záření, přičemž se plynule mění indukce magnetického pole, dokud nedojde k rezonanci. [49] Výsledkem měření jsou hodnoty procentuálního úbytku radikálu ve směsi antioxidant-radikál v závislosti na čase.

Měření antioxidační aktivity extraktů z různých částí bezu s použitím radikálu DPPH se ve studii věnoval Dawidowicz s kol. (2006). Množství polyfenolů a antioxidační aktivity stoupalo v extraktech od listů před plody až po květy s nejvyšším obsahem. [36] Pliszka (2017) prováděla měření antioxidační aktivity bezových extraktů také s radikálem DPPH, a po 30 minutách stanovila inhibici radikálu na hodnotu 88,17 – 88,50 %. [30]

Otázce korelace mezi obsahem fenolických látek a antioxidační aktivitou rostlinných extraktů se věnovali ve svých studiích Dawidowicz s kol. (2006) a Moure a kol. (2001) a došli k závěru, že neexistuje přímá korelace mezi obsahem fenolů a celkovou antioxidační aktivitou. Zatímco je možné zjistit přímou korelaci mezi antioxidační aktivitou a obsahem fenolů u čistých látek, není tomu tak u rostlinných extraktů. [36] [52]

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Původ rostlinného materiálu a jeho skladování

Pro přípravu extraktů byly použity výlisky z plodů bezu černého odrůdy Haschberg, jež pocházely z biosadu družstva Agrofrukt Hustopeče a byly sklizeny v létě roku 2017. Byly vylisovány ve firmě Réva Rakvice a výlisky byly převezeny na Fakultu chemickou VUT v Brně, kde byly v igelitových sáčcích zamrazeny a uchovávány při teplotě -18 °C.

2.2 Laboratorní vybavení

2.2.1 Přístroje

- lednička s mrazničkou (Liebherr, Německo)
- analytické váhy Pioneer (Ohaus, USA)
- třepačka Unimax (Heidolph Instruments, Německo)
- rotační vakuová odparka IKA® WERKE RV 06-ML (IKA WERKE, Německo)
- pH metr inoLab pH 720 (WTW, Německo)
- UV/VIS spektrofotometr Helios γ (ThermoSpectronic, Velká Británie)
- laboratorní míchačka vortex Yellow Line TTS 2 (IKA-Works, USA)
- EPR spektroskop EPR MiniScope 300 (Magnettech, Německo)
- přístroj na přípravu vody pro HPLC (Labicom, ČR)
- ultrazvuková vana (Kraintek s.r.o., SR)
- GC-MS systém (Thermo Fisher Scientific, USA)
 - plynový chromatograf Trace™ 1310 se split/splitless injektorem
 - hmotnostní detektor ISQ™ LT Single Quadrupole
 - PC se softwarem Xcalibur®
 - knihovna spekter NIST/EPA/NIH, Verze 2.0 (Gaithersburg, USA)
- HPLC systém (Shimadzu, Japonsko)
 - kapalinový chromatograf LC-10
 - gradientová pumpa LC-10AD
 - DAD detektor SPD-M10AVP,
 - dávkovací ventil Rheodyne, Model 7725i (ThermoFisher Scientific, USA)
 - PC se softwarem pro řízení a sběr dat CLASS-LC10

2.2.2 Pomůcky

- běžné laboratorní sklo, Büchnerova nálevka, mikrozkušavky, plastové nádoby
- filtrační papír, parafilm, MCE Syringe mikrofiltr (póry: 0,45 μm , průměr: 25 mm)
- laboratorní stojan, stojan na zkumavky, teploměr
- automatická pipeta Sartorius Proline 100–1000 μl (Biohit, Finsko)
- skleněná kyveta, plochá křemenná kyveta EPR 500 μl (Magnettech, Německo)
- lihoměr 20-96 % (Femér KFT, Maďarsko)
- injekční stříkačka 2 ml (Chirana Injecta, SR)
- kolona Kinetex® 5 μm EVO C18 100 Å, 250 \times 4,6 mm (Phenomenex, USA)
- SPME vlákno DVB/CAR//PDMS 50/30 μm (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA)

- vialky 10 ml se šroubovacím magnetickým uzávěrem

2.2.3 Chemikálie a plyny

- destilovaná voda a redestilovaná voda (FCH VUT, Česká Republika)
- Ethanol 96% (Sigma Aldrich, Švýcarsko)
- chlorid draselný p.a. (Lachema, Česká Republika)
- koncentrovaná kyselina chlorovodíková (ONEX, Česká Republika)
- sodná sůl kyseliny octové p.a. (Lachema, Česká Republika)
- bezvodý uhličitán sodný (Lachema a.s., Česká Republika)
- Folin-Ciocalteuovo činidlo (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
- kyselina gallová (Penta, Česká Republika)
- 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), (Sigma-Aldrich, Německo)
- acetonitril Chromasolv, HPLC grade (Sigma Aldrich, Německo)
- kyselina mravenčí, 98% p.a. (Lach-ner s.r.o., Česká Republika)
- standardy kyanidin-3-glukosid a kyanidin-3-sambubiosid (Polyphenols, Norsko)
- helium (čistota 4.8) v tlakové lahvi s redukčním ventilem (SIAD, Česká republika)

2.3 Příprava extraktů z bezových výlisků

Na analytických vahách byly do Erlenmeyerovy baňky naváženy bezové výlisky a ty byly zality přesným množstvím rozpouštědla. Byly testovány poměry 1:1,6, 1:2, 1:2,4 a 1:3,2. Hrdlo baňky bylo přetaženo parafilmem, alobalem a baňka byla umístěna na třepačku. Po uběhnutí daného času, byl extrakt přefiltrován přes Büchnerovu nálevku a do mikrozkuhavky byl odebrán vzorek pro analýzu. Byl změřen objem získaného extraktu a extrakt byl dále využit pro výrobu koncentrátu.

2.4 Příprava koncentrátů extraktů z bezových výlisků

Bezový extrakt byl nalit do baňky s kulatým dnem a se zábrusem a tato byla nasazena na zábrusové hrdlo vakuové odparky. Byla spuštěna vodní vývěva a voda tekoucí do chladiče. Zároveň bylo zapnuto zahřívání vody v hrnci, jejíž teplota byla kontrolována teploměrem umístěným v laboratorním stojanu. Pomocí ventilu bylo zařízení odzdušněno a plocha s hrncem s vodní lázní byla vysunuta tak, aby baňka byla ponořená. Bylo spuštěno otáčení hlavy s baňkou.

Po skončení odpařování bylo zařízení zavzdušněno a byly vypnuty přívody vody a koncentrát i kondenzát byly po změření objemu ve válci přelity do připravených uzavíratelných nádob pro následnou analýzu. Maximální vakuum u použité skleněné vodní vývěvy je výrobcem udáváno jako 100 mmHg (13,3 kPa).

2.5 Stanovení celkových anthokyanových barviv pH-diferenciální metodou

2.5.1 Příprava roztoků

2.5.1.1 pufr o koncentraci $0,025 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ chloridu draselného a pH 1,0

Na analytických vahách bylo naváženo 1,86 g KCl a navážka byla kvantitativně převedena destilovanou vodou do kádinky na 1000 ml. Do kádinky bylo přidáno 980 ml vody. Kádinka byla umístěna na magnetickou míchačku a do roztoku byl ponořen pH metr. Do roztoku byla postupně přidávána koncentrovaná kyselina chlorovodíková až do hodnoty pH 1,0. Pufr byl následně převeden do odměrné baňky na 1000 ml a doplněn destilovanou vodou po značku.

2.5.1.2 pufr octanu sodného koncentraci $0,4 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a pH 4,5

Na analytických vahách bylo naváženo 54,43 g CH_3COONa a navážka byla kvantitativně převedena destilovanou vodou do kádinky na 1000 ml. Do kádinky bylo přidáno 980 ml vody. Kádinka byla umístěna na magnetickou míchačku a do roztoku byl ponořen pH metr. Do roztoku byla postupně přidávána koncentrovaná kyselina chlorovodíková až do hodnoty pH 4,5. Pufr byl následně převeden do odměrné baňky na 1000 ml a doplněn destilovanou vodou po značku.

2.5.2 Příprava vzorků a samotné měření

Vzorky bezového extraktu a jeho koncentráty byly ve zkumavkách naředěny destilovanou vodou podle intenzity zbarvení. Do zkumavky bylo napipetováno 2,5 ml pufru chloridu draselného ($0,025 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a 0,5 ml naředěného vzorku. Do další zkumavky bylo napipetováno 2,5 ml pufru octanu sodného ($0,4 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a 0,5 ml naředěného vzorku. Zkumavky byly promíchány na vortexu. Každý z připravených roztoků byl proměřen na spektrofotometru při vlnových délkách 510 nm a 700 nm. Jako slepý vzorek byla použita destilovaná voda. Měření byla opakována třikrát a pro výpočet byla použita průměrná hodnota ze tří měření.

Výpočet

Majoritním anthokyanovým barvivem v bezu černém je kyanidin-3-glukosid a proto je ve výpočtu použita jeho molekulová hmotnost a molární absorpční koeficient. Celková koncentrace anthokyanů, vyjádřená jako ekvivalent kyanidin-3-glukosidu (CGE) byla vypočtena z následujícího vzorce (Rov. 1):

$$c_{\text{MP}} = \frac{A \cdot M \cdot F \cdot 10^3}{\varepsilon \cdot l} \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \quad (1)$$

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

c_{MP} ... výsledná koncentrace monomerního pigmentu ve vzorku $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$

A ... výsledná hodnota absorbance

M ... molekulová hmotnost pro kyanidin-3-glukosid ($449,2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

F ... faktor ředění (-)

ε ... molární absorpční koeficient pro kyanidin-3-glukosid ($26\,900 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)

l ... délka dráhy průchodu světla vzorkem = délka kyvety (cm)

Celková koncentrace anthokyanů byla následně přepočtena na obsah anthokyanů ve vzorku v mg na 100 g výlisků.

2.6 Stanovení celkových fenolických látek metodou podle Folin-Ciocalteua

2.6.1 Příprava roztoků

2.6.1.1 standardní roztok kyseliny gallové o koncentraci $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$

Na analytických vahách bylo naváženo 0,1 g kyseliny gallové. Navážka byla rozpuštěna v 90 ml destilované vody a kvantitativně převedena do odměrné baňky na 100 ml. Roztok byl doplněn destilovanou vodou po rysku.

2.6.1.2 7,5% roztok uhličitanu sodného

Na analytických vahách bylo naváženo 7,5 g uhličitanu sodného. Navážka byla rozpuštěna v 90 ml destilované vody a kvantitativně převedena do odměrné baňky na 100 ml. Roztok byl doplněn destilovanou vodou po rysku.

2.6.1.3 kalibrační řada

Byla nachystána řada šesti kalibračních roztoků o koncentraci 12,5; 25, 100, 200 a 400 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Do šesti 10ml odměrných baněk bylo postupně napipetováno 0,125; 0,25; 1,0; 2,0; a 4,0 ml standardního roztoku kyseliny gallové a doplněno destilovanou vodou po značku.

Pro vlastní měření bylo do zkumavek napipetováno vždy 0,1 ml zředěného Folin-Ciocalteuova činidla (činidlo ku vodě v poměru 1:9), dále 1,8 ml destilované vody a 0,1 ml nachystaného kalibračního standardu. Roztoky byly promíchány na vortexu a ponechány stát 5 minut. Následně byl do každé zkumavky přidán 1,0 ml 7,5% roztoku uhličitanu sodného a obsah byl opět promíchán na vortexu. Roztoky byly ponechány stát 2 hodiny ve tmě a poté byly proměřeny na spektrofotometru při vlnové délce 750 nm. Slepý vzorek byl připraven stejně, jako kalibrační řada, avšak místo kalibračního standardu byl přidán stejný objem destilované vody.

2.6.2 Příprava vzorků a vlastní měření

Vzorky bezového extraktu byly ve zkumavkách naředěny destilovanou vodou v poměru 1:40 a vzorky jeho koncentrátu v poměru 1:100.

Pro měření každého vzorku bylo do tří zkumavek napipetováno vždy 0,1 ml zředěného Folin-Ciocalteuova činidla (činidlo ku vodě v poměru 1:9), 1,8 ml destilované vody a 0,1 ml zředěného vzorku. Roztoky byly promíchány na vortexu a ponechány stát 5 minut. Následně byl do každé zkumavky přidán 1,0 ml 7,5% roztoku uhličitanu sodného a obsah byl opět promíchán na vortexu. Roztoky byly ponechány stát 2 hodiny ve tmě a poté byly proměřeny na spektrofotometru při vlnové délce 750 nm. Slepý vzorek byl připraven stejně, jako roztok vzorku, avšak místo vzorku byl přidán stejný objem destilované vody.

Výpočet

Z rovnice regrese kalibrační křivky byl vypočítán celkový obsah fenolických látek ve vzorcích jako ekvivalent kyseliny gallové (GAE) v $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

2.7 Stanovení antioxidační aktivity pomocí EPR

Stanovení antioxidačních vlastností bezových extraktů bylo provedeno na EPR spektrometru Magnetech MiniScope 300. Jako radikál byl použit roztok DPPH v methanolu.

2.7.1 Příprava roztoku radikálu, vzorků a vlastní měření

Na analytických vahách bylo naváženo 0,01971 g DPPH a rozpuštěno ve 100 ml methanolu. Odměrná baňka s roztokem radikálu byla obalena alobalem a uložena na 24 hodin do chladničky.

Na roztoku čistého DPPH byly nastaveny parametry (tabulka 1) pro následnou analýzu a byla ověřena stabilita referenčního reakčního systému voda a roztok DPPH (1:1). Následně byla spuštěna samotná analýza, pro kterou byla jako slepý vzorek byla použita směs roztoku DPPH a vody (1:1). Naředěný vzorek byl smíchán s roztokem DPPH (1:1) a směs byla nasáta do kyvety, která byla vložena do spektrometru. Pomocí programu Miniscope Control byla snímána spektra s postupně se snižující amplitudou, která odpovídá postupnému úbytku DPPH v systému. Každý vzorek byl proměřen třikrát. Srovnání antioxidačních vlastností extraktů bylo provedeno vyhodnocením relativního úbytku koncentrace DPPH v čase 24 minut po začátku experimentu.

Tabulka 1: Parametry měření na EPR spektrometru

magnetické pole	(G)	3360
modulace	(mG)	5000
mikrovlnné tlumení	(db)	8
čas cyklu	(s)	10
počet skenů v cyklu	-	6
počet snímaných spekter	-	8

2.8 Analýza složení kondenzátu pro účely recyklace extrakčního činidla

Obsah ethanolu ve směsi ethanol-voda (1:1) používaného pro extrakce byl stanoven pomocí lihoměru při 20 °C. Směs byla nalita do odměrného válce o objemu 100 ml a do válce byl vložen lihoměr. Po ustálení lihoměru byla odečtena hodnota na stupnici, odpovídající hmotnostním procentům ethanolu ve směsi. Obsah ethanolu v kondenzátu získaného v průběhu koncentrace extraktu na vakuové odparce byl stanoven stejným způsobem.

2.9 Stanovení anthokyanových barviv za použití HPLC

2.9.1 Příprava mobilních fází (MF)

Pro separaci anthokyanových barviv byly použity dvě mobilní fáze. MF A byla připravena smícháním redestilované vody a acetonitrilu v poměru 97:3 a pH mobilní fáze bylo upraveno na hodnotu 1,8 kyselinou mravenčí. MF B byla připravena smícháním vody a acetonitrilu v poměru 40:60 a její pH bylo opět upraveno na hodnotu 1,8 kyselinou mravenčí. Poté byly

obě mobilní fáze odplyněny po dobu 10 minut v ultrazvukové lázni. Tyto MF a jejich poměry byly zvoleny na základě dříve publikované diplomové práce. [53]

2.9.2 HPLC analýza vzorků a kalibrační křivka

Reálné vzorky i standardy byly eluovány izokratickou elucí s použitím MF A a MF B, které byly namíchané do požadovaného poměru pomocí směšovače. Parametry použité pro separaci jsou uvedeny v tabulce 2. Vzorky koncentrátu byly naředěny vodou. Vzorky i standardy byly dávkovány manuálně dávkovacím šesticestným kohoutem. Postupně byly analyzovány vzorky extraktu a koncentrátu a všechny body kalibrační řady. Každý vzorek byl nadávkován třikrát.

Tabulka 2: Parametry separace anthokyanů

koncentrace MF B	(%)	14
průtok MF (A+B)	(ml·min ⁻¹)	0,5
objem nástřiku	(μl)	5
teplota na koloně	(°C)	26
tlak na koloně	(MPa)	6
rozsah snímaného spektra	(nm)	200-600

Kalibrační křivka

Pro přípravu kalibrační křivky byly použity standardní roztoky kyanidin-3-glukosidu a kyanidin-3-sambubiosidu. Barvivo o hmotnosti 10 mg bylo kvantitativně přeneseno do 10ml odměrné baňky a ta byla doplněna redestilovanou vodou po rysku. Takto byl získán zásobní roztok o koncentraci 1 mg·ml⁻¹, ze kterého byly ředěním získány koncentrace pro sestavení kalibrační křivky 0,005 mg·ml⁻¹, 0,01 mg·ml⁻¹, 0,02 mg·ml⁻¹, 0,05 mg·ml⁻¹ a 0,10 mg·ml⁻¹.



Obrázek 6: Přístroj HPLC Shimadzu

2.10 Stanovení aromaticky aktivních látek pomocí GC-MS

K analýze těkavých aromatických složek obsažených ve slupkách z bezinek byl použit plynový chromatograf TRACE 1310 v kombinaci s mikroextrakční technikou SPME. K identifikaci jednotlivých sloučenin byl použit hmotnostní spektrometr (MS).

2.10.1 Příprava vzorků a GC-MS analýza

Do třech vialek pro SPME extrakci byly zvlášť nadávkovány vzorky – 1 g rozmražených bezových výlisků, 1 ml extraktu a 1 ml koncentráту. Vialky byly umístěny do plata automatického dávkovače a byla spuštěna analýza. Byl získán chromatogram a hmotnostní spektrum, přičemž výsledky byly vyhodnoceny pomocí softwaru XCalibur®.

Podmínky SPME extrakce:

- doba inkubace (temperování) 10 min, doba extrakce 20 min, teplota extrakce a inkubace (teplota agitátoru) 40 °C
- agitátor zapnutý 5 s, vypnutý 60 s
- množství vzorku 1 ml, hloubka ponoření vlákna do vialky 20 mm

Podmínky GC-MS analýzy:

- kapilární kolona TG–WaxMS (30 m x 0,25 mm x 0,5 μm)
- teplota injektoru (desorpce) 240 °C, doba desorpce 20 min, dávkování splitless, ventil uzavřený 10 min, hloubka ponoření vlákna do injektoru 40 mm, nosný plyn hélium, přítok 1 ml·min⁻¹
- teplotní program: 40 °C s výdrží 1 min., vzestupný gradient 1 °C/min do 50 °C s výdrží 1 min, vzestupný gradient 5 °C·min⁻¹ do 200 °C s výdrží 5 min, celková doba analýzy 47 min

- hmotnostní detektor v módě EI, energie ionizačních elektronů 70 eV, teplota iontového zdroje 200 °C, skenovací rozsah m/z 30–370 amu, rychlost skenování 0,2 s



Obrázek 7: Příklad přístroje GC-MS Thermo Fisher Scientific

2.11 Statistické zpracování naměřených dat

Získaná naměřená data byla dále statisticky zpracována. Pro všechna měření byl počítán průměr, směrodatná odchylka a interval spolehlivosti. Zpracování bylo provedeno pomocí počítačového programu Microsoft Excel.

Každé měření vzorku bylo provedeno třikrát. Z těchto tří měření byl pro další výpočet vypočten průměr, použitím funkce PRŮMĚR. Odlehlé hodnoty výsledků byly případně vyloučeny. Dále byla v programu Microsoft Excel z výsledků měření vypočtena směrodatná odchylka použitím funkce SMODCH. Následně byla použitím funkce CONFIDENCE odchylka rozšířena pro interval spolehlivosti 95 %. Tato hodnota nejistoty měření pak byla spolu s průměrnou hodnotou uvedena ve výsledcích.

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Náplní praktické části diplomové práce byla extrakce výlisků z plodů bezu černého, bezinek za účelem získání co největšího množství zbylých anthokyanových barviv. Bylo proto nutné optimalizovat samotný proces extrakce z jak z chemického hlediska, tak i s přihlédnutím k hledisku ekonomickému. Získaný extrakt bylo nutno stabilizovat, zakonzentrovat, aby jej bylo možno uchovávat. V získaném extraktu i koncentrátu pak byly stanoveny vybrané chemické vlastnosti, významné pro další využití produktů v potravinářském průmyslu.

V připraveném koncentrátu, případně extraktu či výliscích z bezinek byly stanoveny tyto parametry:

- obsah anthokyanových barviv kapalinovou chromatografií pH-diferenciální metodou
- stanovení fenolických látek Folin-Ciocalteuovou metodou
- stanovení antioxidační aktivity extraktu pomocí EPR
- analýza těkavých aromatických látek.

3.1 Optimalizace poměru materiálu a rozpouštědla

Byla provedena série extrakcí s cílem zjistit nejvhodnější poměr materiál/rozpouštědlo. Pro všechny provedené extrakce byl zvolen stejný postup přípravy, avšak různé poměry materiál/rozpouštědlo. K extrakci byla tedy zvolena směs 50 % ethanol/voda (V/V). Stejný poměr použili ve studii z roku 2009 i Pompeu a kol. [16] Ethanol, jako rozpouštědlo, je pro použití v potravinářském průmyslu vhodný a povolený.

Celkem byly testovány čtyři různé poměry výlisků a rozpouštědla (hmota **m** ku objemu **V**). Podle kapitoly 2.3 byla navážka 25,0 g výlisků postupně extrahována 80 ml, 60 ml, 50 ml a 40 ml rozpouštědla, které mělo vždy složení 50 % ethanol a 50 % voda (V/V). Všechny extrakce trvaly 10 hodin. Tento čas i poměr ethanol/voda vychází z výsledků dříve vypracované bakalářské práce. [55] Výtěžnost extrakce byla hodnocena na základě stanovení celkového obsahu anthokyanových barviv.

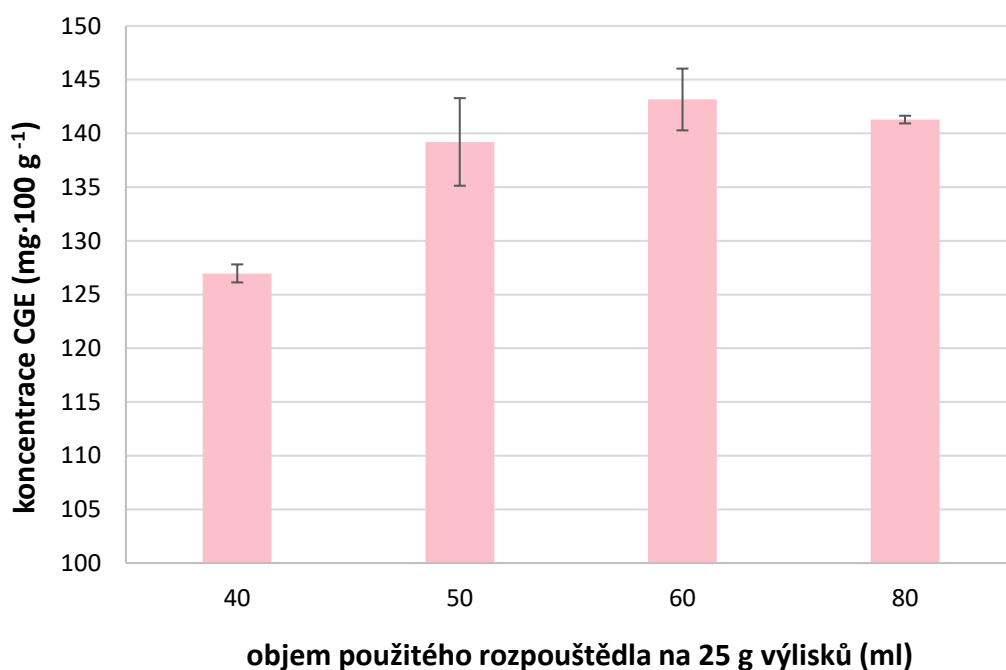
Výsledky měření obsahu anthokyanových barviv v jednotlivých extraktech v čase 10 hodin jsou uvedeny v tabulce 3. Hodnoty jsou dále i s chybovými úsečkami vyneseny do grafu 1. Obsah celkových anthokyanových barviv v tabulce je vyjádřen jako ekvivalent monomerního pigmentu kyanidin-3-glukosidu v $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ výlisků ($\text{mg CGE} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$). Výtěžky jsou uvedeny s hodnotou intervalu spolehlivosti na hladině statistické významnosti 0,05.

Tabulka 3: Obsah celkových anthokyanových barviv v extraktech v $\text{mg CGE} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ v čase 10 h

m výlisků (g)	V rozpouštědla (ml)	výlisky/rozpouštědlo (m/V)	CGE ($\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$)
25,0	80,0	1:3,2	141,3 ± 1,3
25,0	60,0	1:2,4	143,2 ± 2,3
25,0	50,0	1:2,0	139,2 ± 1,4
25,0	40,0	1:1,6	127,0 ± 1,2

Z hodnot v tabulce 3 a grafu 1 vyplývá, že množství vyextrahovaných barviv se zvyšuje se snižujícím se poměrem výlisky/rozpouštědlo. Nárůst je patrný mezi poměry 1:1,6 a 1:2 (výlisky/rozpouštědlo). Poté výtěžky stagnují kolem hodnoty $141,2 \pm 1,6 \text{ mg CGE} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ pro poměry 1:2, 1:2,4 a 1:3,2. Pompeu a kol. ve své studii z roku 2009 došli ke stejnému závěru. A to, že se snižujícím poměrem materiál/rozpouštědlo se zvyšuje množství vyextrahovaných barviv vlivem většího koncentračního gradientu, a tedy i rychlosti difuze. Avšak při určitém objemu už k nárůstu nedochází. [16] Výsledky se liší i mezi jednotlivými autory. Cacao a Mazza ve studii z roku 2003 uvádí nejvhodnější poměr rozpouštědlo/materiál přibližně pětkrát vyšší než Pompeu a kol. [15]

Z výsledků vyplývá, že je pro získání extraktu s nejvyšším obsahem barviv vhodné použít poměr výlisky/rozpouštědlo 1:2 (m/V). Při tomto poměru je použito nejmenší množství rozpouštědla s maximálním výtěžkem. V průmyslovém měřítku to odpovídá použití 200 litrů extrakční směsi na 100 kilogramů výlisků.



Graf 1: Koncentrace celkových anthokyanů v závislosti na objemu extrakčního činidla

Doba extrakce byla, po konzultaci se zadavatelem, prodloužena na 12,0 hodiny a aplikována pro výrobu všech dalších extraktů. Po tuto dobu či déle bude v praxi extrakce probíhat, pokud se nechá běžet přes noc.

3.2 Stanovení antioxidační aktivity bezového extraktu

Byly porovnány antioxidační aktivity bezových extraktů o různé koncentraci anthokyanů. Pro měření byly použity vzorky o třech různých koncentracích. Měření bylo provedeno na přístroji EPR dle postupu uvedeného v kapitole 2.5.3. Jako stabilní radikál byl použit roztok DPPH. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4: Inhibice radikálu DPPH v (%) v závislosti na koncentraci barviv ve vzorku

CGE (g·l ⁻¹)	inhibice DPPH (%)
0,4	15,5
0,6	25,1
0,8	45,2

Z výsledků vyplývá, že se zvyšující se koncentrací anthokyanů v extraktu stoupá antioxidační aktivita. Inhibice DPPH při koncentraci barviv 0,8 g·l⁻¹ byla 2,9krát větší než při poloviční koncentraci. Podle literatury však mezi obsahem anthokyanových barviv a antioxidační aktivitou neexistuje přímá korelace. Jakkoli je možné zjistit přímou korelaci mezi koncentrací čistých látek a antioxidačními vlastnostmi jejich roztoku, není to jednoduché u rostlinných extraktů. [36]

3.3 Recyklace rozpouštědla

Potravinářský ethanol, nutný pro extrakce anthokyanových barviv, je poměrně náročná surovina jak z finančního, tak i z administrativního hlediska. Proto bylo cílem tohoto experimentu posoudit, zda a jak je možné snížit finanční náročnost extrakce.

Před extrakcí barviv byla kalibrovaným lihoměrem ověřena hodnota objemových procent ethanolu v připravené extrakční směsi 50 % ethanol/voda (V/V) (extrakční směs A). Dále byla stanovena hodnota objemových procent ethanolu v kondenzátu získaném po koncentrování extraktu na vakuové odparce. Kondenzát byl následně použit jako extrakční činidlo pro novou extrakci (extrakční směs B). Tento krok byl nazván recyklace (opětovné použití) extrakčního činidla. V obou případech byl použit poměr výlisky/rozpouštědlo 1:2 (m/V). V obou extraktech byla výtěžnost extrakcí (obsah anthokyanových barviv) stanovena pomocí pH-diferenciální metody. Obsah ethanolu ve směsích A a B a výtěžky barviv z jednotlivých extrakcí spolu s hodnotou intervalu spolehlivosti na hladině statistické významnosti 0,05 jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5: Obsah ethanolu ve směsi A a B a obsah barviv získaných extrakcemi vyjádřený v CGE

C _{EIOH (A)} (obj. %)	53
C _{EIOH (B)} (obj. %)	42
CGE _(A) (mg·100 g ⁻¹)	198,0 ± 1,2
CGE _(B) (mg·100 g ⁻¹)	168,9 ± 2,4

Rozdíl mezi objemovou koncentrací ethanolu v původní směsi (A) a kondenzátu (B) byl stanoven pomocí lihoměru na 11 % (tabulka 5). Tento pokles mohl být způsoben vytěkáním ethanolu během manipulace s extraktem, především při filtraci extraktu přes Büchnerovu nálevku a dále během odpařování, kdy jsou páry ethanolu částečně strhávány do místa

výstupu vývěvy. Současně není známo, kolik ethanolu a vody zůstalo obsaženo v získaném koncentrátu barviv.

Byly provedeny extrakce s použitím směsí A i B po dobu 12 hodin. S použitím kondenzátu jako rozpouštědla (směs B) byl získán, dle očekávání, o 14,7 % nižší výtěžek barviv než s použitím čerstvě připravené extrakční směsi. Využití kondenzátu jako rozpouštědla pro další extrakci je tedy možné. Bylo by však vhodné doplnit do takto získané směsi takové množství ethanolu, aby byl poměr opět 50 % ethanol/voda (V/V).

3.4 Degradace barviv při přípravě koncentráту na vakuové odparce

Dále byl zjišťován vliv teploty vodní lázně vakuové odparky na úroveň degradace anthokyanových barviv v koncentráту.

Byly připraveny 3 extrakty bezových výlisků podle kapitoly 2.3. Tyto extrakty byly poté zakonzentrovány při třech různých teplotách vodní lázně odparky: 65 °C, 60 °C a 45 °C. Konzentrování extraktů trvalo ve všech případech 15 minut. Po této době došlo ve všech případech k žádoucímu zahuštění extraktu.

K posouzení míry degradace byla opět využita pH-diferenciální metoda. Byl stanoven obsah anthokyanů v extraktu (E) a v příslušném koncentráту (K). Rozdíl získaných čísel byl vyhodnocen jako množství barviv, která podlehla degradaci a byl vyjádřen v procentech Viz tabulka 6, v níž je uveden interval spolehlivosti na hladině statistické významnosti 0,05. Každá hodnota je průměrem ze 3 opakování.

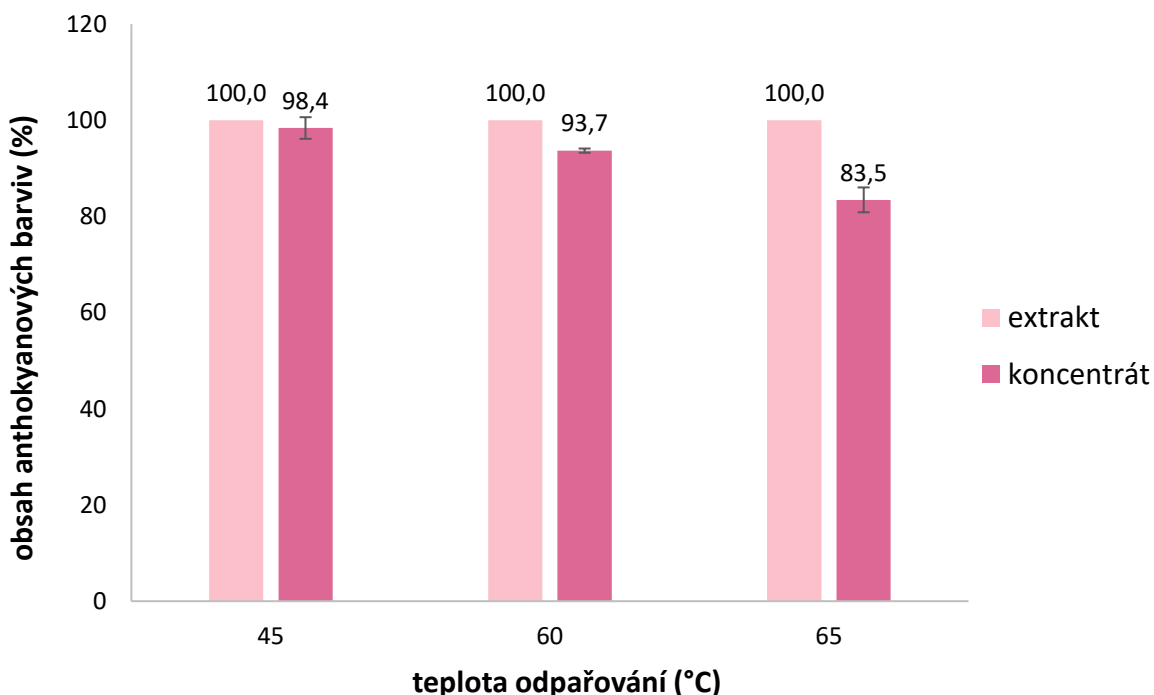
Tabulka 6: Degradace barviv v procentech pro různé teploty vodní lázně vakuové odparky

T (°C)	CGE _(E) - CGE _(K) (%)
65	16,5 ± 2,6
60	6,3 ± 0,4
45	1,6 ± 2,3

CGE_(E) – celkový obsah anthokyanů v extraktu vyjádřený jako kyanidin-3-glukosid ekvivalent

CGE_(K) – celkový obsah anthokyanů v koncentráту vyjádřený jako kyanidin-3-glukosid ekvivalent

Procentuální úbytek barviv pro tři teploty je graficky znázorněn v grafu 2 společně s intervaly spolehlivosti, které jsou vyneseny jako chybové úsečky. Z grafu 2 je patrné, že stupeň degradace barviv klesá, dle očekávání, s klesající teplotou odpařování. Při teplotě 65 °C byl pozorován úbytek barviv o 16,5 ± 2,6 % a pro 45 °C o 1,6 ± 2,3 % z celkového obsahu v extraktu. Také Fazaeli a kol. ve své studii z roku 2013 pozorovali zvyšující se degradaci anthokyanových barviv při zvyšující se teplotě při odpařování. [7] Zahřívání na nižší teplotu je současně méně energeticky náročné, proto byla teplota 45 °C vyhodnocena jako nejvhodnější teplota pro získání koncentráту vakuovou odparkou.



Graf 2: Obsah anthokyanů před a po odpařování extraktu vyjádřený v procentech

3.5 Stanovení vlastností výsledného produktu

Podle výše optimalizovaného postupu byl připraven výsledný produkt, bezový koncentrát. Extrakt připravený v poměru výlisky/rozpouštědlo 1:2 (m/V) byl zahuštěn na vakuové odparce 15 minut při teplotě 45 °C na 7,4krát menší objem. Byl stanoven obsah barviv v koncentrátu pomocí HPLC analýzy a porovnán s výsledky z pH-diferenciální metody.

Tabulka 7: Podmínky výroby výsledného koncentrátu

V_E (ml)	148,0
V_K (ml)	20,0
T (°C)	45
t (min)	15

3.5.1 HPLC analýza anthokyanových barviv

Anthokyanová barviva obsažená v koncentrátu byla separována na koloně Kinetex® EVO C18 Core-Shell zapojené do kapalinového chromatografu Shimadzu. Byla vyhodnocována detektorem s diodovým polem při vlnové délce 520 nm. Barviva byla kvantifikována srovnáním se standardy. Jako standardy byly použity majoritní barviva bezinek: kyanidin-3-gluosid (C3G) a kyanidin-3-sambubiosid (C3S); kap. 2.9.

3.5.1.1 Kalibrační křivka

Kalibrační závislost tvoří pět různých koncentrací každého ze dvou standardů – kyanidin-3-gluosidu a kyanidin-3-sambubiosidu. Tyto byly připraveny způsobem popsáným v kapitole 2.7.3. Každý standard byl nadávkován samostatně, pro ověření retenčního času, který mu byl následně přiřazen v případě nástřiku směsi. V tabulce 8 jsou uvedeny výsledné koncentrace, průměrné hodnoty retenčních časů a plochy píků jednotlivých kalibračních bodů. Z uvedených hodnot byla sestrojena závislost plochy píku na koncentraci barviva v roztoku pro každý standard a vynesena do grafu 3 a 4 (viz příloha).

Tabulka 8: Průměrné hodnoty kalibračních bodů standardů

koncentrace (mg·ml ⁻¹)	kyanidin-3-sambubiosid		kyanidin-3-glukosid	
	t _R (min)	plocha píku	t _R (min)	plocha píku
0,005	7,5	78571	7,9	152396
0,010	7,3	169772	7,6	226493
0,020	7,6	305880	8,0	634944
0,050	7,6	929677	8,0	1144822
0,100	7,6	1859355	8,0	2354870

Z regresních rovnic kalibračních křivek (viz příloha graf 3 a 4) jednotlivých standardů bylo přepočítáno množství těchto barviv v koncentrátu (tabulka 9).

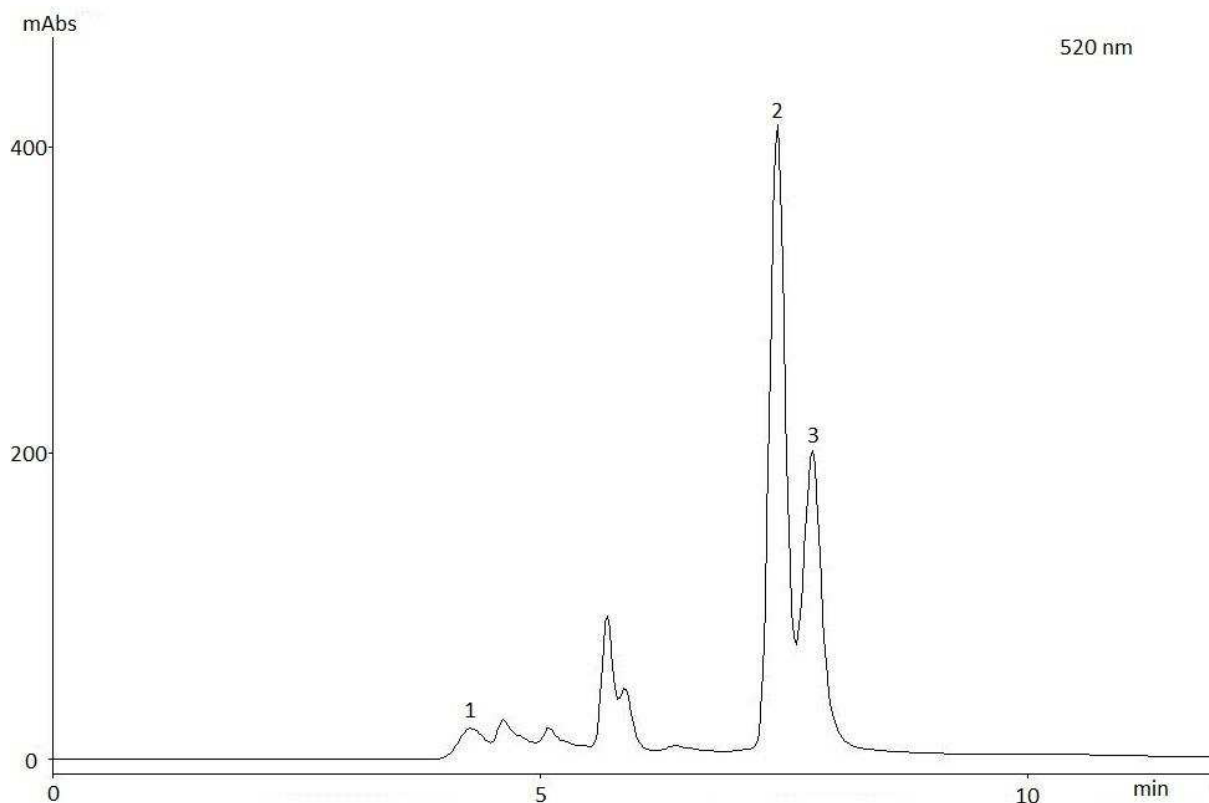
3.5.1.2 Stanovení obsahu majoritních barviv v koncentrátu

Ve výsledném produktu – bezovém koncentrátu – byla provedena separace obsažených barviv a kvantifikace pomocí externích standardů majoritních barviv. Parametry a provedení HPLC analýzy byly popsány výše v kapitole 2.7.4. Detekce proběhla při 520 nm. Hodnoty obsahu dvou analyzovaných barviv jsou uvedeny s hodnotou intervalu spolehlivosti na hladině statistické významnosti 0,05 v tabulce 9.

Tabulka 9: Plochy píků a koncentrace anthokyanů stanovené HPLC ve výsledném koncentrátu

glykosid	plocha píku (mAu·min)	C (mg·l ⁻¹)
kyanidin-3-sambubiosid	4523455	22727,7 ± 346,9
kyanidin-3-glukosid	2467426	12140,8 ± 167,2
suma		34868,5

Celková koncentrace dvou majoritních pigmentů v koncentrátu byla stanovena na hodnotu 34,9 g·l⁻¹.



Obrázek 8: HPLC chromatogram bezového koncentrátu při 520 nm
1: mrtvý objem; 2: kyanidin-3-sambubiosid; 3: kyanidin-3-glukosid

3.5.2 Stanovení celkového obsahu monomerního pigmentu

Ve výsledném koncentrátu byl stanoven celkový obsah barviv pH-diferenciální metodou dle postupu v kapitole 2.3.3. Obsah barviv je uveden v tabulce 10 včetně intervalu spolehlivosti na hladině statistické významnosti 0,05.

Tabulka 10: Celková koncentrace anthokyanů v koncentrátu

CGE ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	$7067,0 \pm 1,2$
---------------------------------------	------------------

Celkový obsah barviv, stanovený chromatograficky (HPLC) a získaný jako součet dvou měřených majoritních barviv, byl stanoven na hodnotu $34,9 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Ve stejném výsledném koncentrátu byl pH-diferenciální metodou stanoven celkový obsah anthokyanových barviv na hodnotu $7,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Celkový obsah anthokyanů stanovený HPLC je mnohem vyšší než hodnota získaná pH-diferenciální metodou. Pro výpočet koncentrace v případě pH-diferenciální metody byl použit molární absorpční koeficient (ε) pro kyanidin-3-glukosid. Z HPLC analýzy však vyplývá jako majoritní barvivo ve vzorku kyanidin-3-sambubiosid. Pro tento glykosid nebyla dohledána hodnota ε . Pro jednotlivé glykosidy se však hodnoty ε liší a je tedy potřeba brát v úvahu nepřesnost výpočtu při použití ε barviva, jenž není ve vzorku majoritní.

Zásobní roztoky standardů byly uchovávány v lednici po dobu tří týdnů před samotným měřením bodů kalibrační řady. Dá se tedy očekávat, že koncentrace zásobních roztoků

v průběhu uchovávání poklesla, avšak pro výpočet kalibračních bodů byla použita původní výchozí koncentrace. Dá se tedy předpokládat, že naměřené plochy píků ve skutečnosti odpovídají nižším hodnotám koncentrace, a tedy i vypočtené koncentrace vzorků jsou nadhodnocené. Celkově lze tedy usoudit, že rozdíl mezi výsledky jednotlivých metod je zatížen výše zmíněnými chybami.

Vyšší hodnoty získané z HPLC oproti pH-diferenciální metodě však uvádí také literatura. Lee a Finn (2007) stanovili pomocí HPLC 2krát vyšší hodnoty, Lee a kol. (2008) dokonce až 7krát vyšší hodnoty obsahu anthokyanů. [32] [56]

3.5.3 Stanovení celkového obsahu fenolických látek

Ke stanovení celkových fenolických látek ve výsledném koncentrátu bylo využito Folin-Ciocalteuovy metody dle postupu v kapitole 2.4.3. Ze standardu kyseliny gallové byly namíchané roztoky různých koncentrací a sestrojena kalibrační křivka (viz příloha graf 5), podle které byly kvantifikovány fenolické látky koncentrátu. Celkový obsah fenolických látek je uveden v tabulce 11 jako ekvivalent kyseliny gallové (GAE) v $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ s hodnotou intervalu spolehlivosti na hladině statistické významnosti 0,05.

Tabulka 11: Celkový obsah fenolických látek v koncentrátu

GAE ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	27060,2 ± 784,0
---------------------------------------	-----------------

Celkový obsah fenolických látek byl stanoven na hodnotu $27,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, což je hodnota 3,8krát vyšší než obsah celkových anthokyanů naměřený pH-diferenciální metodou. Kromě anthokyanů je v bezu černém dle literatury obsaženo větší množství kyseliny chlorogenové a rutinu, jenž mohou tvořit velkou část celkového obsahu fenolických látek. [56]

3.5.4 Stanovení aromaticky aktivních látek pomocí GC-MS

Na základě porovnání s literaturou bylo vybráno 35 aromatických látek, které se v bezu vyskytují nejčastěji. [57] Přítomnost těchto látek byla sledována ve vzorku výlisků bezinek jakožto výchozím materiálu (B), v extraktu z výlisků (E) a v samotném koncentrátu z tohoto extraktu (K). Seznam sledovaných látek je uveden v tabulce 12 a v případě identifikace látky ve vzorku je uveden její retenční čas pro daný vzorek. Některé píky byly identifikovány jako siloxany, které se uvolnily z SPME vlákna. Tyto nebyly uvedeny do tabulek 12 a 13. Jednotlivé chromatogramy získané jako výsledek analýzy jsou uvedeny v příloze a souhrnně jako *obrázek 9*.

Tabulka 12: Identifikované aromatické látky s retenčními časy t_R (min)

aromatická látka	B	E	K	aromatická látka	B	E	K
	t_R (min)	t_R (min)	t_R (min)		t_R (min)	t_R (min)	t_R (min)
alkoholy				aldehydy			
benzyl alkohol	36,23	36,23	36,23	benzaldehyd	27,95	27,96	27,96
fenylethyl alkohol	36,96	36,96	36,96	fenylacetaldehyd	-	-	-
geraniol	-	-	-	nonanal	24,04	24,05	24,05

aromatická látka	B	E	K	aromatická látka	B	E	K
	t _R (min)	t _R (min)	t _R (min)		t _R (min)	t _R (min)	t _R (min)
alkoholy				aldehydy			
hotrienol	-	-	-	2-oktenal	-	-	-
hexan-1-ol	22,77	22,77	22,79	ketony			
2-hexen-1-ol	-	-	-	beta-damascenon	-	-	-
3-hexen-1-ol	23,77	-	23,80	uhlovodíky			
linalool	28,30	28,30	-	o-cimen	19,79	-	-
2-metylbutan-1-ol	-	-	-	limonen	16,69	16,62	16,69
3-metylbutan-1-ol	17,55	17,53	17,54	estery			
oktan-1-ol	-	28,55	-	etyl acetát	-	-	-
1-okten-3-ol	25,69	-	-	etyl butyrát	35,98	-	35,99
pentan-1-ol	-	-	-	etyl decanoát	30,56	30,56	30,56
alfa-terpineol	29,80	-	-	etyl oktanoát	25,20	-	25,19
aldehydy		-		butyl acetát	-	-	-
heptanal	-	-	-	metyl acetát	-	-	-
hexanal	-	-	10,66	heterocykly			
(E)-2-hexenal	-	-	-	(Z)-linalool oxid	-	-	-
oktanal	-	20,61	-	nerol oxid	-	-	-
pentanal	-	-	-	(Z)-rose oxid	-	-	-

Celkem 15 látek bylo detekováno ve vzorku výlisků, 11 látek v extraktu výlisků a 12 látek v koncentrátu tohoto extraktu.

V plodech bezu byly identifikovány také další látky, které nebyly stanoveny jako nejčastěji se vyskytující. Tyto jsou uvedeny v tabulce 13.

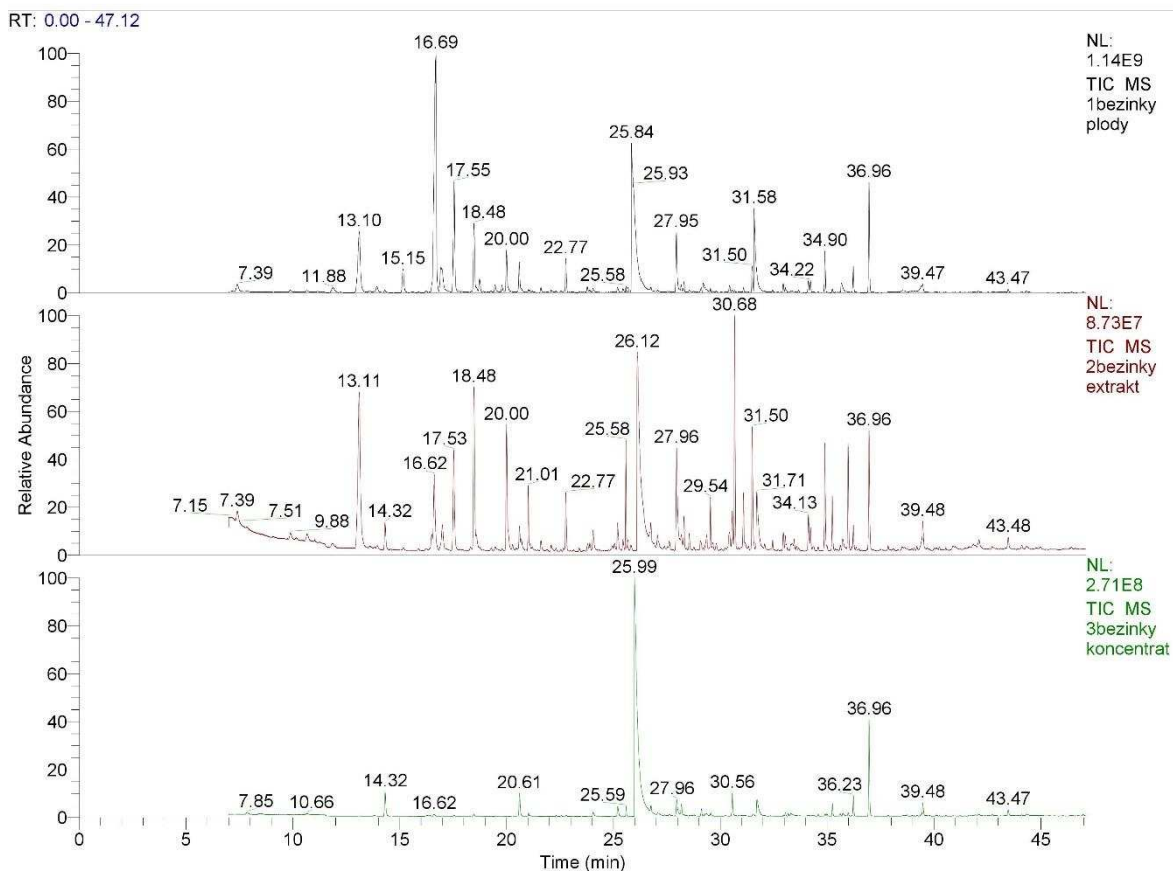
Tabulka 13: Identifikované aromatické látky s retenčními časy t_R (min)

aromatická látka	B	E	K	aromatická látka	B	E	K
	t _R (min)	t _R (min)	t _R (min)		t _R (min)	t _R (min)	t _R (min)
alkoholy				estery			
2,3-butandiol	28,17	28,18	28,17	etyl hexanoát	18,48	18,47	-
isobutanol	11,88	-	-	etyl laurát	35,24	35,24	-
levomentol	30,68	30,68	-	etyl myristát	39,47	-	39,48
1-nonanol	31,09	31,08	-	<u>etyl non-3-enoát</u>		29,36	
1-oktanol	-	-	28,55	etyl palmitát	43,47	-	43,47
ketony				fenetyl acetát	34,90	34,90	-
acetoin	20,59	-	20,61	hexyl acetát	20,00	20,00	-
alfa-ceton	-	-	35,61	hexyl isovalerát	25,45	25,45	-
2-nonanon	23,89	23,89	-	isobutyl acetát	7,39	-	-
uhlovodíky				isoamyl isovalerát	-	20,69	-
beta-myrcen	15,15	15,17	-	isopentyl acetát	13,10	13,11	-
gamma-terpinen	18,74	-	-	metyl benzoát	30,44	30,43	-

aromatická látka	B	E	K	aromatická látka	B	E	K
	t _R (min)	t _R (min)	t _R (min)		t _R (min)	t _R (min)	t _R (min)
uhlovodíky				estery			
trichlormetan	7,84	-	7,85	metyl salicylát	34,12	34,13	-
estery				kyseliny			
benzyl acetát	32,94	32,95	-	hexanová kyselina	35,66	35,72	-
etyl benzoát	31,50	31,50	-	3-metylbutanová kyselina	31,58	31,71	31,72
etyl fenylacetát	34,22	34,23	-	2-metylpropanová kyselina	29,20		
etyl heptanoát	-	22,08	-	octová kyselina	25,84	26,12	25,99

Dalších 27 látek bylo detekováno ve vzorku výlisků, 22 látek v extraktu výlisků a 9 látek v koncentrátu tohoto extraktu (tabulka 13).

Celkově bylo tedy identifikováno 42 aromatických látek extrahovaných přímo z rozmražených bezových výlisků, 33 aromatických látek v extraktu z výlisků a 21 aromatických látek ve výsledném produktu – koncentrátu. Nejvíce zastoupenou skupinou detekovaných látek byly estery. Některé látky stanovené v extraktu nebo koncentrátu dokonce nebyly stanoveny ve vzorku výlisků. Byly tak uvolněny z materiálu až následnou extrakcí a dalšími kroky.



Obrázek 9: GC chromatogramy analyzovaných vzorků, shora postupně bezové výlisky, extrakt a koncentrát

Z chromatogramů (*obrázek 9*) a tabulek 12 a 13 je patrné, že počet identifikovaných látek se snižoval v průběhu výroby koncentráту. Ve výsledném produktu bylo stanoveno 2krát méně látek než ve výchozím materiálu. Lze předpokládat, že většina aromatických látek byla extrakcí vyluhována do rozpouštědla, přesto 9 z původních 42 látek nebylo v extraktu detekováno. Vysvětlením může být, že v průběhu extrakce mohla část látek vyprchat do prostoru Erlenmayerovy baňky, ve které probíhala extrakce. Dále se snížil počet těchto látek při odpařování na vakuové odparce, jelikož jsou těkavé a byly tak společně s plyny strhávány pryč vodní vývěvou. Ve výsledném produktu tak bylo stanoveno 21 těkavých látek oproti 42 látkám ve výchozím materiálu.

4 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce byla příprava koncentráту extraktu z bezových výlisků a definování jeho charakteristických vlastností, především obsahu barviv.

Výlisky z bezinek byly extrahovány rozpouštědlem o složení 1:1 ethanol/voda (V/V). Složení extrakčního činidla bylo převzato z bakalářské práce [55], zaměřené na obdobnou problematiku.

V úvodních experimentech této diplomové práce byl hledán optimální poměr mezi navázkou výlisků a objemem použitého extrakčního činidla. Byly zkoumány následující poměry výlisky/rozpouštědlo 1:1,6; 1:2,0; 1:2,4; 1:3,2; (m/V). Výtěžnost extrakcí byla hodnocena na základě stanovení celkového obsahu anthokyanových barviv pH-diferenciální metodou. Obsah barviv v jednotlivých extraktech byl stanoven jako ekvivalent majoritního pigmentu kyanidin-3-glukosidu. Poměr 1:2 se ukázal být provedením s nejvyšším výtěžkem a současně nejmenší spotřebou rozpouštědla.

Dále byla elektronovou paramagnetickou rezonancí zkoumána míra antioxidačních vlastností připravených extraktů. K tomu byly použity 3 extrakty s různou koncentrací anthokyanů. Jejich celková antioxidační aktivita byla vyjádřena v procentech jako úbytek stabilního radikálu DPPH po smíchání s extrakty. Z výsledků vyplývá, že s rostoucí koncentrací bezového extraktu (potažmo koncentrátu) roste i jeho antioxidační aktivita. Tato skutečnost je uváděna také v literatuře, ačkoli přímá korelace mezi koncentrací a antioxidačními vlastnostmi nebyla prokázána.

Byl rovněž hodnocen vliv teploty vodní lázně vakuové odparky na úroveň degradace anthokyanových barviv v koncentrátu. 3 extrakty byly zakonzentrovány při třech různých teplotách vodní lázně odparky: 65 °C, 60 °C a 45 °C. Zahušťování extraktů trvalo ve všech 3 případech 15 minut. pH-diferenciální metodou byl stanoven obsah barviv výchozího extraktu a výsledného koncentrátu. Z těchto hodnot byl vypočten rozdíl, který byl posouzen jako úbytek barviv vlivem jejich degradace. S klesající teplotou byla zjištěna nižší míra degradace. Při teplotě 65 °C byla zjištěna degradace $16,5 \pm 2,6$ % z původní hodnoty, při 45 °C to bylo $1,6 \pm 2,3$ %.

Kvůli snížení finanční náročnosti celého procesu byla zkoumána možnost opětovného použití kondenzátu z vakuové odparky k extrahování výlisků. Zachycený kondenzát z odparky obsahoval 42 objemových % ethanolu. K extrakci výlisků byl použit ve stejném poměru jako výchozí činidlo, tj. výlisky/rozpouštědlo 1:2 (m/V). Při nižším obsahu ethanolu byl, dle očekávání, získán nižší obsah barviv. Rozpouštědlo by tak v případě opětovného použití bylo potřeba doplnit na původní obsah alkoholové složky.

Výsledný produkt byl tedy získán koncentrací extraktu na vakuové odparce při teplotě lázně 45 °C, déle odpařování 15 minut a za předpokladu maximálního výkonu vodní vývěvy, tj. 2,67 kPa. Tento produkt měl 7krát menší objem než výchozí extrakt.

Finální produkt byl charakterizován stanovením majoritních anthokyanů kapalinovou chromatografií, stanovením celkových anthokyanů pH-diferenciální metodou, stanovením celkových fenolických látek podle Folin-Ciocalteu a identifikací hlavních aromatických látek plynovou chromatografií.

Majoritní anthokyany byly separovány na univerzální koloně Kinetex® EVO C18 Core-Shell. Byly eluovány v pořadí kyanidin-3-sambubiosid (C3S) a kyanidin-3-glukosid (C3G). Jejich celkový obsah byl stanoven na hodnotu 34,9 g·l⁻¹ koncentráту.

Celkový obsah anthokyanů ve finálním produktu činil 7,1 g·l⁻¹ a byl vypočítán jako ekvivalent kyanidu-3-glukosidu.

Obsah fenolických látek v koncentráту byl 27,1 g·l⁻¹, vyjádřeno jako ekvivalent kyseliny gallové. Vyšší obsah fenolických látek oproti anthokyanům znamená, že jsou v koncentráту extraktu z bezových slupek obsaženy výrazně také jiné fenolické látky. Podle literatury především kyselina chlorogenová a rutin.

K identifikaci aromatických látek využita kombinace GC-MS a SPME. Ve vzorku bezových výlisků bylo stanoveno celkem 42 aromatických látek, 33 aromatických látek bylo stanoveno v extraktu z výlisků a 21 aromatických látek ve výsledném produktu – koncentráту. Nejvíce zastoupenou skupinou detekovaných látek byly estery. Identifikované aromatické látky výrazně přispívají k typické vůni bezové šťávy a dalších produktů.

Výsledky této práce by měly posloužit jako podklad pro producenty výrobků z bezových plodů. Měly by upozornit na možnost využití výlisků po lisování bezové šťávy k dalšímu zpracování a zisku barviv přírodního původu s antioxidačními vlastnostmi a pozitivním působením na lidské zdraví. Laboratorně připravený koncentrát se všemi jeho atributy by byl vhodný pro použití v potravinářství. V dalších studiích by bylo možné se zaměřit na využití jiných, šetrnějších způsobů koncentrace, jako je například použití mikrovlnného záření či lyofilizace.

5 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KORBELÁŘ, Jaroslav a Zdeněk ENDRIS. *Naše rostliny v lékařství*. 7. vyd. Ilustrace Jindřich Krejča. Praha: Avicenum, 1990, 501 s. ISBN 80-201-009-1
- [2] HEMGESBERG, Hanspeter. *Černý bez a naše zdraví: květy, listy a plody černého bezu léčí všechny potíže*. Překlad Anděla Kramlová. Olomouc: Fontána, 2002, 158 s. ISBN 80-861-7998-2.
- [3] Plants Database. *United States Department of Agriculture* [online]. Washington, DC: USDA, 2015 [cit. 2018-02]. Dostupné z: <http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=SANI4>
- [4] ATKINSON, Mark D. a Elaine ATKINSON. *Sambucus nigra L.* *Journal of Ecology* [online]. 2002, **90**(5), 895-923. DOI: 10.1046/j.1365-2745.2002.00698.x. ISSN 00220477. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2745.2002.00698.x>
- [5] DOLEJŠÍ, Antonín, Vladimír KOTT a Lubomír ŠENK. *Méně známé ovoce*. Praha: Brázda, 1991, 149 s. Zahrádka (Brázda). ISBN 80-209-0188-4.
- [6] *Sambucus nigra*. In: *Pixabay* [online]. Germany: pixabay, 2016 [cit. 2018-03-20]. Dostupné z: <https://pixabay.com/en/elder-elderberries-sambucus-nigra-1609129/>
- [7] FAZAELI, Mahboubeh, Ghazale HOJJATPANAH a Zahra EMAM-DJOMEH. Effects of heating method and conditions on the evaporation rate and quality attributes of black mulberry (*Morus nigra*) juice concentrate. *Journal of Food Science and Technology* [online]. 2013, **50**(1), 35-43. DOI: 10.1007/s13197-011-0246-y. ISSN 0022-1155. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s13197-011-0246-y>
- [8] MASKAN, Aysun, Sevim KAYA a Medeni MASKAN. Effect of concentration and drying processes on color change of grape juice and leather (pestil). *Journal of Food Engineering* [online]. 2002, **54**(1), 75-80. DOI: 10.1016/S0260-8774(01)00187-X. ISSN 02608774. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S026087740100187X>
- [9] BATES, R. P., J. R. MORRIS a P. G. CRANDALL. *Principles and practices of small- and medium-scale fruit juice processing*. 1. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2001. ISBN 92-5-104661-1.
- [10] SKREDE, G., R.E. WROLSTAD a R.W. DURST. Changes in Anthocyanins and Polyphenolics During Juice Processing of Highbush Blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Journal of Food Science* [online]. 2000, **65**(2), 357-364. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2000.tb16007.x. ISSN 0022-1147. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2000.tb16007>.
- [11] POLÁŠKOVÁ, A., J. SPILKOVÁ, A. MATĚJÍČEK a H. STUDENÁ. Factors affecting the actual yield of active substances from anthocyanin-rich berries / Faktory ovlivňující skutečný výtěžek aktivních látek z plodů bohatých na anthokyany. *Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae* [online]. 2015, **62**(s9), -. DOI: 10.1515/afpuc-2015-0006. ISSN 1338-6786. Dostupné také z: <https://doaj.org/article/d4609e8b49f747e689ee71ac03e0690a?frbrVersion=2>
- [12] GONZÁLEZ-CENTENO, María Reyes, Kai KNOERZER, Henry SABAREZ, Susana SIMAL, Carmen ROSSELLÓ a Antoni FEMENIA. Effect of acoustic frequency and power density on the aqueous ultrasonic-assisted extraction of grape pomace (*Vitis vinifera* L.) – A response surface approach. *Ultrasonics Sonochemistry* [online]. 2014, **21**(6), 2176-2184. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2014.01.021. ISSN 13504177. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1350417714000418>

- [13] NOUR, Violeta, Franci STAMPAR, Robert VEBERIC a Jerneja JAKOPIC. Anthocyanins profile, total phenolics and antioxidant activity of black currant ethanolic extracts as influenced by genotype and ethanol concentration. *Food Chemistry* [online]. 2013, **141**(2), 961-966. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.03.105. ISSN 03088146. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814613004512>
- [14] KHAN, Muhammad Kamran, Maryline ABERT-VIAN, Anne-Sylvie FABIANO-TIXIER, Olivier DANGLES a Farid CHEMAT. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry* [online]. 2010, **119**(2), 851-858. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.08.046. ISSN 03088146. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814609010437>
- [15] CACACE, J.E. a G. MAZZA. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering* [online]. 2003, **59**(4), 379-389. DOI: 10.1016/S0260-8774(02)00497-1. ISSN 02608774. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877402004971>
- [16] POMPEU, D.R., E.M. SILVA a H. ROGEZ. Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using Response Surface Methodology. *Bioresource Technology* [online]. 2009, **100**(23), 6076-6082. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.03.083. ISSN 09608524. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852409006464>
- [17] OPLETAL, Lubomír a Jan VOLÁK. *Rostliny pro zdraví*. Praha: Aventinum, 1999, 176 s. ISBN 80-715-1074-2.
- [18] SIDOR, Andrzej a Anna GRAMZA-MICHAŁOWSKA. Advanced research on the antioxidant and health benefit of elderberry (*Sambucus nigra*) in food – a review. *Journal of Functional Foods*. 2015, **18**, 941-958. DOI: 10.1016/j.jff.2014.07.012. ISSN 17564646. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464614002400>
- [19] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 3*. Vyd. 2. upr. Tábor: OSSIS, 2002, xii, 343 s. ISBN 80-866-5902-X.
- [20] MANGANARIS, George A, Vlasios GOULAS, Ariel R VICENTE a Leon A TERRY. Berry antioxidants: small fruits providing large benefits. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 2014, **94**(5), 825-833. DOI: 10.1002/jsfa.6432. ISSN 00225142. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.6432>
- [21] SOTO-VACA, Adriana, Ashley GUTIERREZ, Jack N. LOSSO, Zhimin XU a John W. FINLEY. Evolution of Phenolic Compounds from Color and Flavor Problems to Health Benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2012, **60**(27), 6658-6677. DOI: 10.1021/jf300861c. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf300861c>
- [22] TANAKA, Yoshikazu, Nobuhiro SASAKI a Akemi OHMIYA. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal* [online]. 2008, **54**(4), 733-749. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2008.03447.x. ISSN 0960-7412. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-313X.2008.03447.x>
- [23] VEBERIC, R, J JAKOPIC, F STAMPAR a V SCHMITZER. European elderberry (*Sambucus nigra* L.) rich in sugars, organic acids, anthocyanins and selected polyphenols. *Food Chemistry*. 2009, **114**(2), 511-515. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.09.080. ISSN 03088146. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814608011710>

- [24] XIA, Jinxin, Yajun LIU, Shengbo YAO, Ming LI, Mengqing ZHU, Keyi HUANG, Liping GAO a Tao XIA. Characterization and Expression Profiling of *Camellia sinensis* Cinnamate 4-hydroxylase Genes in Phenylpropanoid Pathways. *Genes* [online]. 2017, **8**(8), 193-. DOI: 10.3390/genes8080193. ISSN 2073-4425. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/2073-4425/8/8/193>
- [25] SZAJDEK, Agnieszka a E. J. BOROWSKA. Bioactive Compounds and Health-Promoting Properties of Berry Fruits: A Review. *Plant Foods for Human Nutrition* [online]. 2008, **63**(4), 147-156. DOI: 10.1007/s11130-008-0097-5. ISSN 0921-9668. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11130-008-0097-5>
- [26] SANTOS-BUELGA, Celestino, Nuno MATEUS a Victor DE FREITAS. Anthocyanins. Plant Pigments and Beyond. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2014, **62**(29), 6879-6884. DOI: 10.1021/jf501950s. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf501950s>
- [27] DEL RIO, Daniele, Gina BORGES a Alan CROZIER. *Berry flavonoids and phenolics: bioavailability and evidence of protective effects* [online]. DOI: 10.1017/S0007114510003958. ISBN 10.1017/S0007114510003958. Dostupné také z: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0007114510003958
- [28] WEBER, Fabian a Lena Rebecca LARSEN. Influence of fruit juice processing on anthocyanin stability. *Food Research International* [online]. 2017, (100), 354-365. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.06.033. ISBN 10.1016/j.foodres.2017.06.033. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996917302867>
- [29] INAMI, Osamu, Itaru TAMURA, Hiroe KIKUZAKI a Nobuji NAKATANI. Stability of Anthocyanins of *Sambucus canadensis* and *Sambucus nigra*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 1996, **10**(44), 3090-3096. DOI: 10.1021/jf9507809. ISBN 10.1021/jf9507809. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf9507809>
- [30] PLISZKA, Barbara. Polyphenolic content, antiradical activity, stability and microbiological quality of elderberry (*sambucus nigra* L.) extracts. *Acta Scientiarum Polonorum. Technologia Alimentaria* [online]. 2017, **16**(4), 393-401. DOI: 10.17306/J.AFS.2017.0523. ISSN 16440730. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29241318>
- [31] MALIEN-AUBERT, C., O. DANGLES a M. J. AMIOT. Color Stability of Commercial Anthocyanin-Based Extracts in Relation to the Phenolic Composition. Protective Effects by Intra- and Intermolecular Copigmentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2001, **49**(1), 170-176. DOI: 10.1021/jf000791o. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf000791o>
- [32] LEE, Jungmin a Chad E. FINN. Anthocyanins and other polyphenolics in American elderberry (*Sambucus canadensis*) and European elderberry (*S. nigra*) cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 2007, **87**(14), 2665-2675. DOI: 10.1002/jsfa.3029. ISBN 10.1002/jsfa.3029. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.3029>
- [33] KAACK, Karl, Xavier C. FRETTE, Lars P. CHRISTENSEN, Anne-Katrine LANDBO a Anne S. MEYER. Selection of elderberry (*Sambucus nigra* L.) genotypes best suited for the preparation of juice. *European Food Research and Technology*. 2008, **226**(4), 843-855. DOI: 10.1007/s00217-007-0605-0. ISSN 1438-2377. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00217-007-0605-0>

- [34] VATAI, Tünde, Mojca ŠKERGET a Željko KNEZ. Extraction of phenolic compounds from elder berry and different grape marc varieties using organic solvents and/or supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Engineering* [online]. 2009, **90**(2), 246-254. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2008.06.028. ISBN 10.1016/j.jfoodeng.2008.06.028. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877408003178>
- [35] YIKRAZUUL. Cyanidin 3-O-glucoside. In: *Wikimedia Commons* [online]. San Francisco, USA: Wikimedia, 2009 [cit. 2018-03-26]. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cyanidin_3-O-glucoside.svg
- [36] DAWIDOWICZ, Andrzej L., Dorota WIANOWSKA a Barbara BARANIAK. The antioxidant properties of alcoholic extracts from *Sambucus nigra* L. (antioxidant properties of extracts). *Food Science and Technology*. 2006, **39**(3), 308-315. DOI: 10.1016/j.lwt.2005.01.005. ISSN 00236438. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643805000113>
- [37] DUYSMUŞ, Hale Gamze, Fatih GÖGER a K. Hüsnü Can BAŞER. In vitro antioxidant properties and anthocyanin compositions of elderberry extracts. *Food Chemistry* [online]. Elsevier, 2014, **155**, 112-119. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.01.028. ISSN 0308-8146. Dostupné také z: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0308814614000491>
- [38] ZHAO, Chang, Zhong CHEN, Xue BAI, Can DING, Ting LONG, Fu WEI a Kang MIAO. Structure–activity relationships of anthocyanidin glycosylation. *Molecular Diversity* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2014, **18**(3), 687-700. DOI: 10.1007/s11030-014-9520-z. ISSN 1381-1991. Dostupné také z: <https://linkspringer.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/article/10.1007/s11030-014-9520-z>
- [39] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 2*. Tábor: OSSIS, 1999, 304 s. ISBN 80-902391-2-9.
- [40] JENSEN, Karina, Lars P CHRISTENSEN, Merete HANSEN, Ulla JØRGENSEN a Karl KAACK. Olfactory and quantitative analysis of volatiles in elderberry (*Sambucus nigra* L) juice processed from seven cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. Chichester, UK: John Wiley, 2001, **81**(2), 237-244 [cit. 2018-03-23]. DOI: 10.1002/1097-0010(20010115)81:2<237::AID-JSFA8093.0.CO;2-H. ISSN 0022-5142. Dostupné také z: [https://doi-org.ezproxy.lib.vutbr.cz/10.1002/1097-0010\(20010115\)81:2<237::AID-JSFA809>3.0.CO;2-H](https://doi-org.ezproxy.lib.vutbr.cz/10.1002/1097-0010(20010115)81:2<237::AID-JSFA809>3.0.CO;2-H)
- [41] LEE, Jungmin, Robert W. DURST a Ronald E. WROLSTAD. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *Journal of AOAC International*. Arlington, VA: AOAC International, 2005, **88**(5), 1269–1278. ISSN 1944-7922. Dostupné také z: <http://www.ars.usda.gov/main/main.htm>
- [42] BAJČAN Daniel, Lubos HARANGOZO, Diana HRABOVSKÁ a Dominika BONČÍKOVÁ. Optimizing conditions for spectrophotometric determination of total polyphenols in wines using folin-ciocalteu reagent. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* [online]. Slovak University of Agriculture, 2013, **2**, 1271-1280. ISSN 1338-5178. Dostupné také z: <https://doaj.org/article/8c54c96155d8434da73c9ca192dc5c54>
- [43] AGBOR, Gabriel A., Joe VINSON a Patrick E. DONNELLY. Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay. *International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics (IJFS)*. 2014, **3**(8). ISSN 2326-3350. Dostupné také z: <http://scidoc.org/articlepdfs/IJFS/IJFS-2326-3350-03-801.pdf>
- [44] FANALI, Salvatore. *Liquid chromatography: fundamentals and instrumentation*. Waltham: Elsevier, c2013. ISBN 978-0-12-415807-8.

- [45] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4244-0.
- [46] ROUESSAC, Francis a Annick ROUESSAC. *Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques*. 2nd ed. Hoboken, NJ: John Wiley, c2007. ISBN 978-0-470-85903-2.
- [47] VOLKA, Karel, Jaroslav FOGL, Milan POPL a Miloslav SUCHÁNEK. *Analytická chemie II*. Praha: VŠCHT, 1997, 236 s. ISBN 80-7080-227-8.
- [48] CHARVÁTOVÁ, Michaela. Využití metody SPME při analýze látek pocházejících z polymerů kontaminujících potravní řetězce (SOP). In: *Fakulta veterinární hygieny a ekologie* [online]. Brno [cit. 2018-03-20]. Dostupné také z: <https://fvhe.vfu.cz/static/informace-o-fakulte/sekce-ustavy/uvozp/metoda-spme/index.html>
- [49] WEIL, John A. (John Ashley) a James R. BOLTON. *Electron paramagnetic resonance: elementary theory and practical applications*. 2nd ed. Hoboken: John Wiley, 2007, xxiii, 664 s. : il. ISBN 978-0-471-75496-1.
- [50] AZMAN, Nurul A. M., Sara PEIRÓ, Lluís FAJARÍ, Luis JULIÀ a Maria Pilar ALMAJANO. Radical Scavenging of White Tea and Its Flavonoid Constituents by Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2014, **62**(25), 5743-5748. DOI: 10.1021/jf501707p. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf501707p>
- [51] LEVÊQUE, Philippe P., Quentin GODECHAL a Bernard GALLEZ. EPR Spectroscopy and Imaging of Free Radicals in Food. *Israel Journal of Chemistry* [online]. Weinheim: WILEY-VCH Verlag, 2008, **48**(1), 19-26. DOI: 10.1560/IJC.48.1.19. ISSN 0021-2148. Dpstupné také z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1560/IJC.48.1.19>
- [52] MOURE, Andrés, Daniel FRANCO, Jorge SINEIRO, Herminia DOMÍNGUEZ, María José NÚÑEZ a Juan M. LEMA. Antioxidant activity of extracts from Gevuina avellana and Rosa rubiginosa defatted seeds. *Food Research International* [online]. 2001, **34**(2-3), 103-109. DOI: 10.1016/S0963-9969(00)00136-8. ISSN 09639969. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996900001368>
- [53] PEPRNÁ, Tereza. *Anthokyanová barviva ve vybraném ovoci* [online]. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická, 2011 [cit. 2018-04-16]. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/11012/8969>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická. Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Milena Vespalcová.
- [54] LOŠKOVÁ, Tereza. *Studium extrakce biologicky aktivních látek z bezových výlisků* [online]. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická, 2016 [cit. 2018-03-19]. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/11012/58871>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická. Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Milena Vespalcová.
- [55] LEE, Jungmin, Christopher RENNAKER a Ronald E. WROLSTAD. Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry*. 2008, **110**(3), 782-786. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.03.010. ISBN 10.1016/j.foodchem.2008.03.010. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030881460800304X>
- [56] MIKULIC-PETKOVSEK, Maja, Justyna SAMOTICHA, Klemen ELER, Franci STAMPAR a Robert VEBERIC. Traditional elderflower beverages: a rich source of phenolic compounds with high antioxidant activity. *Journal of agricultural and food chemistry*[online]. 2015, **63**(5), 1477. DOI:

10.1021/jf506005b. Dostupné také z: <https://pubs-acsc-org.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/abs/10.1021/jf506005b>

[57] VITOVÁ, E, R DIVISOVÁ, K SUKALOVÁ a A MATEJICEK. Determination and quantification of volatile compounds in fruits of selected elderberry cultivars grown in Czech Republic. *Journal Of Food And Nutrition Research* [online]. VUP FOOD RESEARCH INST, BRATISLAVA, 2013, **52**(1), 1-11 [cit. 2018-04-25]. ISSN 1336-8672. Dostupné také z: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=SK2013000192>

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
DAD	detektor s diodovým polem
EPR	elektronová paramagnetická rezonance
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
ABTS	2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazolin-6sulfonová kyselina
TEMPOL	4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxyl
C _{MP}	koncentrace monomerního pigmentu
CGE	ekvivalent kyanidin-3-glukosidu
GAE	ekvivalent kyseliny gallové
GC	plynová chromatografie
MS	hmotnostní spektrometrie
SPME	mikroextrakce tuhou fází

7 SEZNAM PŘÍLOH

Tabulka 14 Průměrné hodnoty pro výpočet koncentrací extraktů při různých poměrech v/r

Tabulka 15 Parametry pro výpočet degradace anthokyanů během odpařování při 45 °C

Tabulka 16 Parametry pro výpočet degradace anthokyanů během odpařování při 60 °C

Tabulka 17 Parametry pro výpočet degradace anthokyanů během odpařování při 65 °C

Tabulka 18 Naměřené hodnoty pro sestrojení kalibrační křivky fenolických látek

Graf 3: Kalibrační křivka kyanidin-3-sambubiosidu

Graf 4: Kalibrační křivka kyanidin-3-glukosidu

Graf 5: Kalibrační křivka fenolických látek

Obrázek 10: GC chromatogram těkavých látek v bezových výliscích

Obrázek 11: GC chromatogram těkavých látek v extraktu bezových výlisků

Obrázek 12: GC chromatogram těkavých látek v koncentrátu z extraktu bezových výlisků

8 PŘÍLOHY

Tabulka 14: Průměrné hodnoty pro výpočet koncentrací extraktů při různých poměrech v/r

výlisky/rozpouštědlo (m/V)	CGE (mg·l ⁻¹)	Ø CGE (mg·l ⁻¹)	CGE (mg·100 g ⁻¹)
1:3,2	441,8	441,6	141,3 ± 1,3
	437,0		
	445,9		
1:2,4	608,1	596,6	143,2 ± 2,3
	592,2		
	589,5		
1:2	701,9	696,0	139,2 ± 1,4
	687,7		
	698,4		
1:1,6	796,3	793,8	127,0 ± 1,2
	784,6		
	800,5		

Tabulka 15: Parametry pro výpočet degradace anthokyanů během odpařování při 45 °C

CGE _(E) (mg·100 g ⁻¹)	198,0	200,4	173,9
CGE _(K) (mg·100 g ⁻¹)	200,4	194,0	169,1
CGE _(E) - CGE _(K) (mg·100 g ⁻¹)	-2,4	6,4	4,9
CGE _(E) - CGE _(K) (%)	-1,2	3,2	2,8
průměr CGE _(E) - CGE _(K) (%)	1,6 ± 2,3		

CGE_E; CGE_K – koncentrace anthokyanů v extraktu; v koncentrátu (vyjádřené jako C3G ekvivalent)

Tabulka 16: Parametry pro výpočet degradace anthokyanů během odpařování při 60 °C

CGE _(E) (mg·100 g ⁻¹)	173,9	174,2	165,9
CGE _(K) (mg·100 g ⁻¹)	163,0	164,0	154,6
CGE _(E) - CGE _(K) (mg·100 g ⁻¹)	10,9	10,2	11,3
CGE _(E) - CGE _(K) (%)	6,3	5,9	6,8
průměr CGE _(E) - CGE _(K) (%)	6,3 ± 0,4		

CGE_E; CGE_K – koncentrace anthokyanů v extraktu; v koncentrátu (vyjádřené jako C3G ekvivalent)

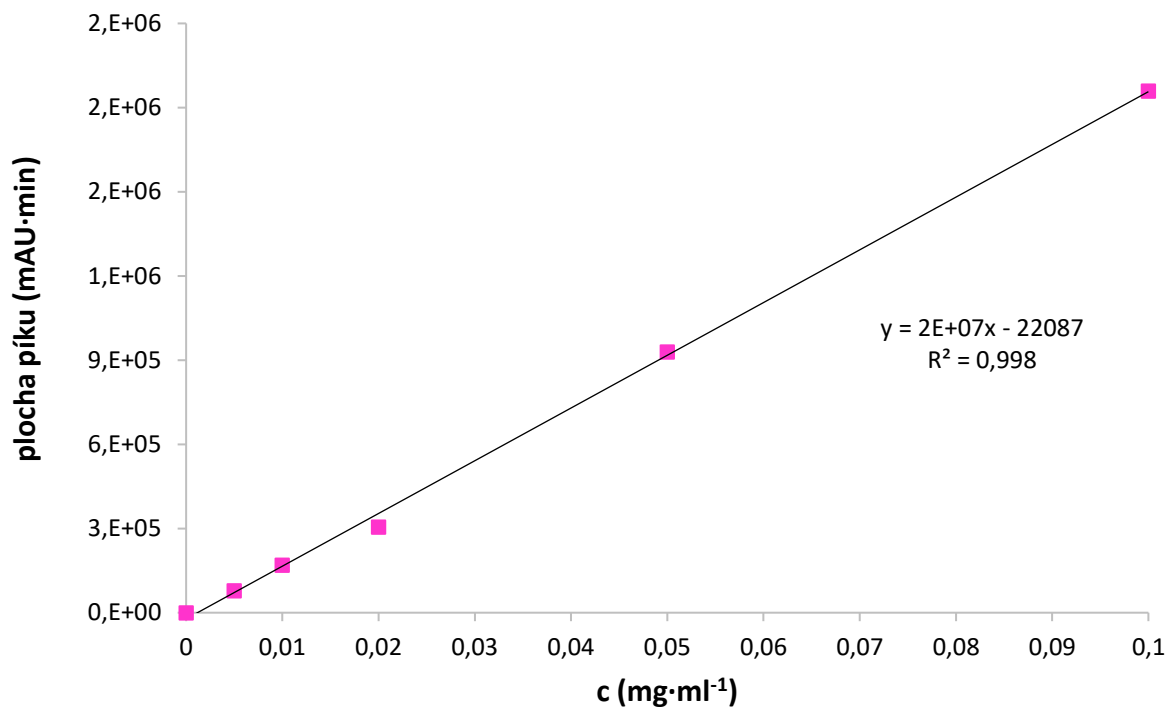
Tabulka 17: Parametry pro výpočet degradace anthokyanů během odpařování při 65 °C

CGE _(E) (mg·100 g ⁻¹)	154,2	121,3	127,0
CGE _(K) (mg·100 g ⁻¹)	126,9	98,7	110,0
CGE _(E) - CGE _(K) (mg·100 g ⁻¹)	27,2	22,6	17,0
CGE _(E) - CGE _(K) (%)	17,7	18,6	13,4
průměr CGE _(E) - CGE _(K) (%)	16,5 ± 2,6		

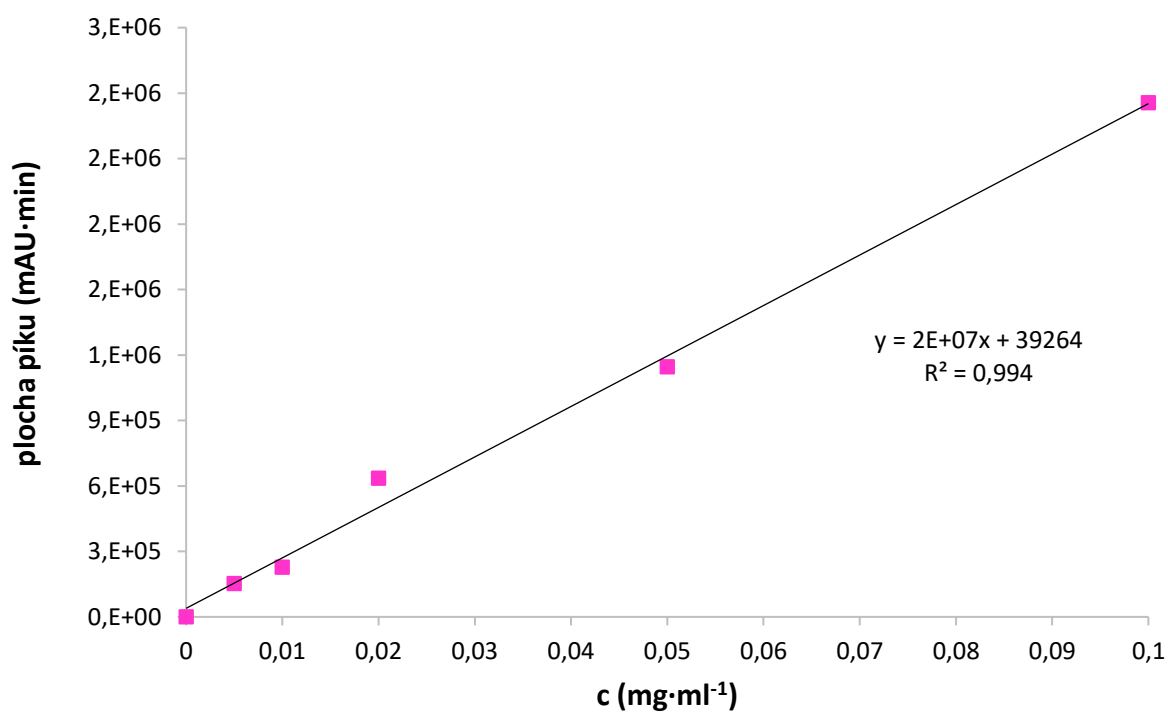
CGE_E; CGE_K – koncentrace anthokyanů v extraktu; v koncentrátu (vyjádřené jako C3G ekvivalent)

Tabulka 18: Naměřené hodnoty pro sestavení kalibrační křivky fenolických látek

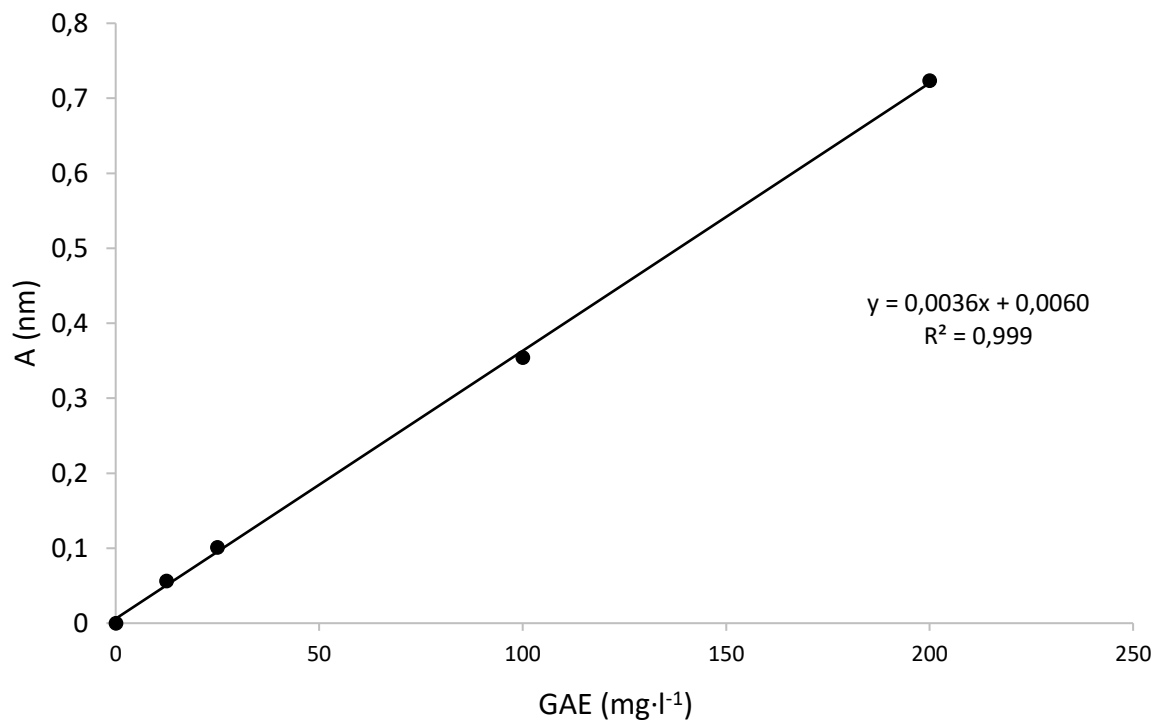
C (mg·l ⁻¹)	A (750 nm)	Ø A (750 nm)
12,5	0,052	0,056
	0,042	
	0,075	
25,0	0,111	0,101
	0,099	
	0,093	
100,0	0,338	0,354
	0,384	
	0,341	
200,0	0,713	0,724
	0,726	
	0,732	



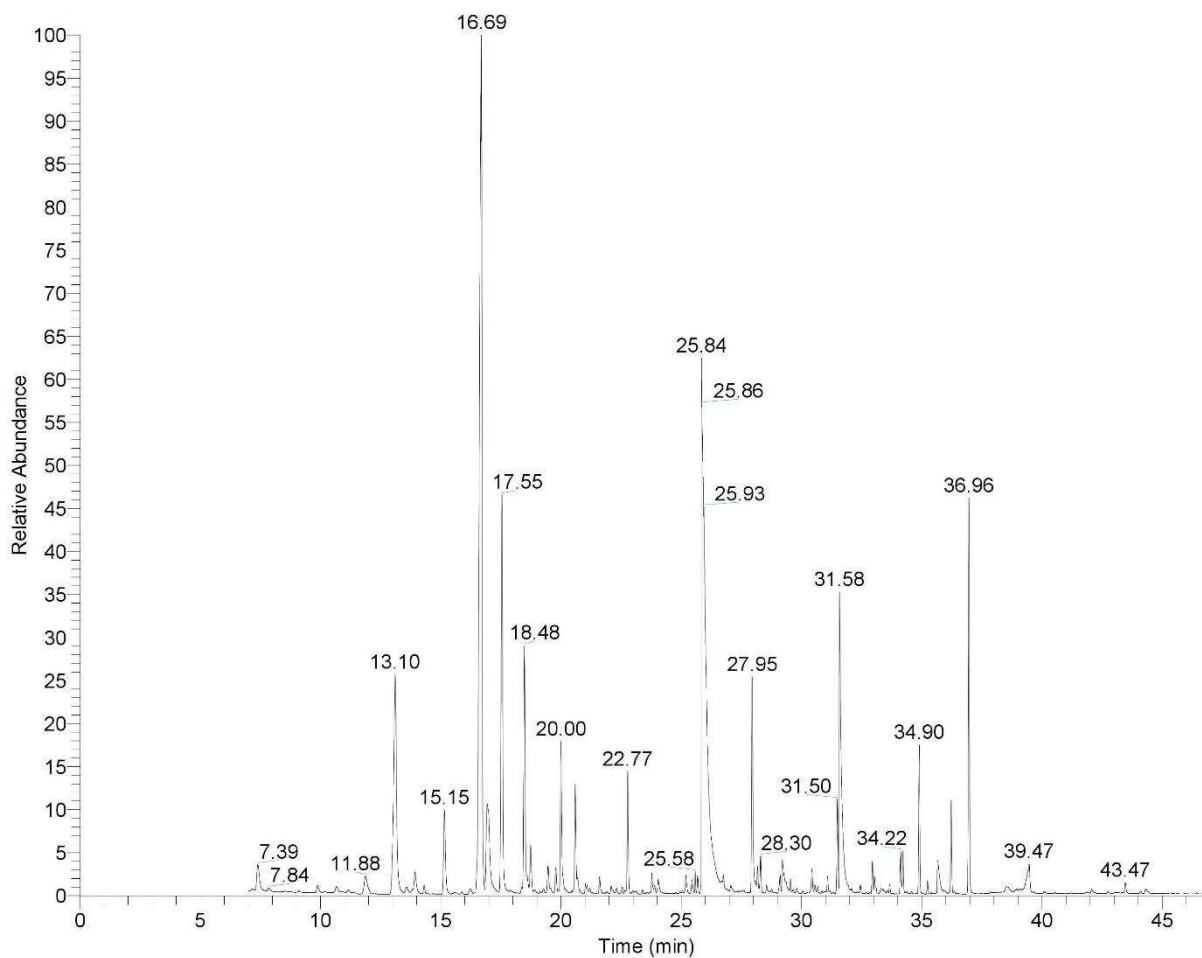
Graf 3: Kalibrační křivka kyanidin-3-sambubiosidu



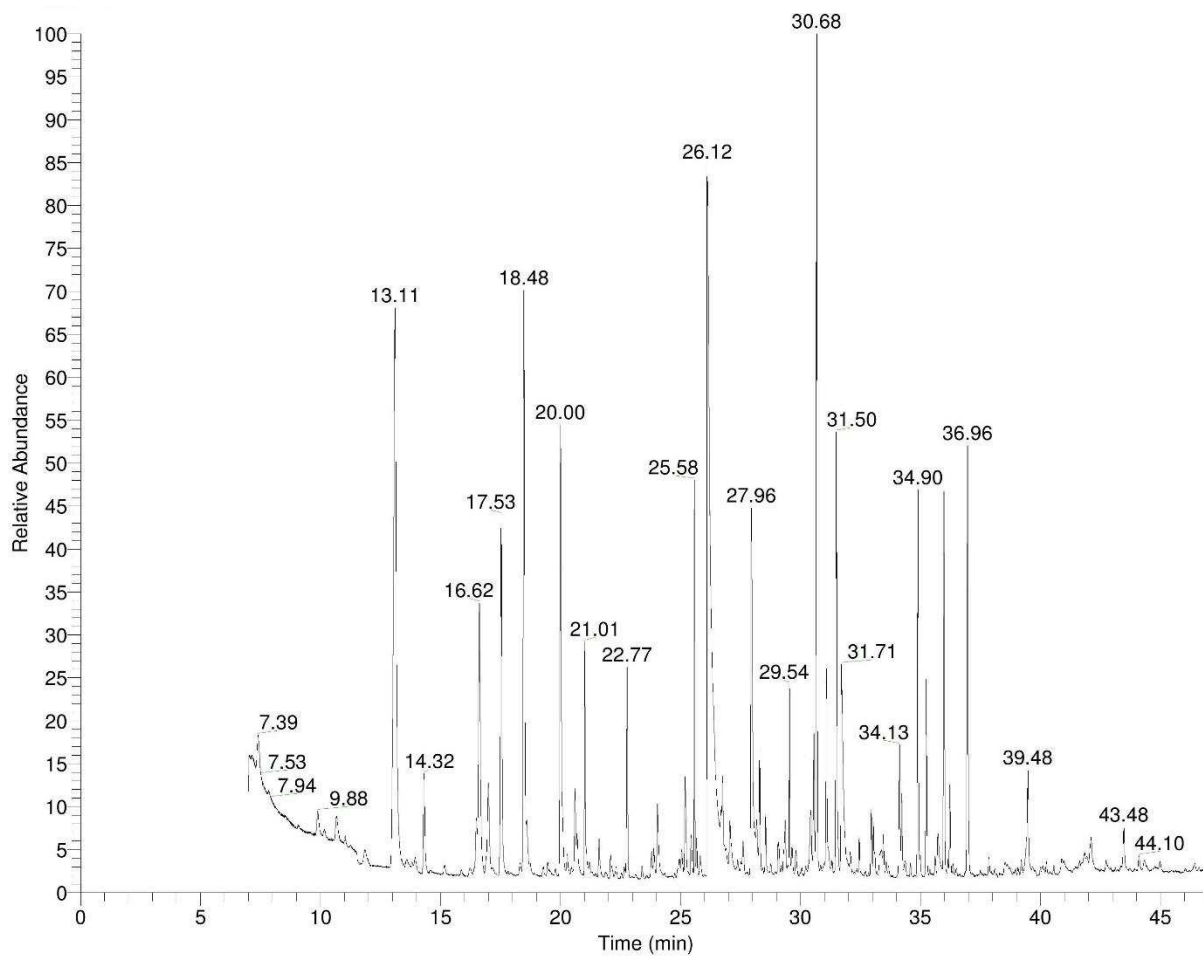
Graf 4: Kalibrační křivka kyanidin-3-glukosidu



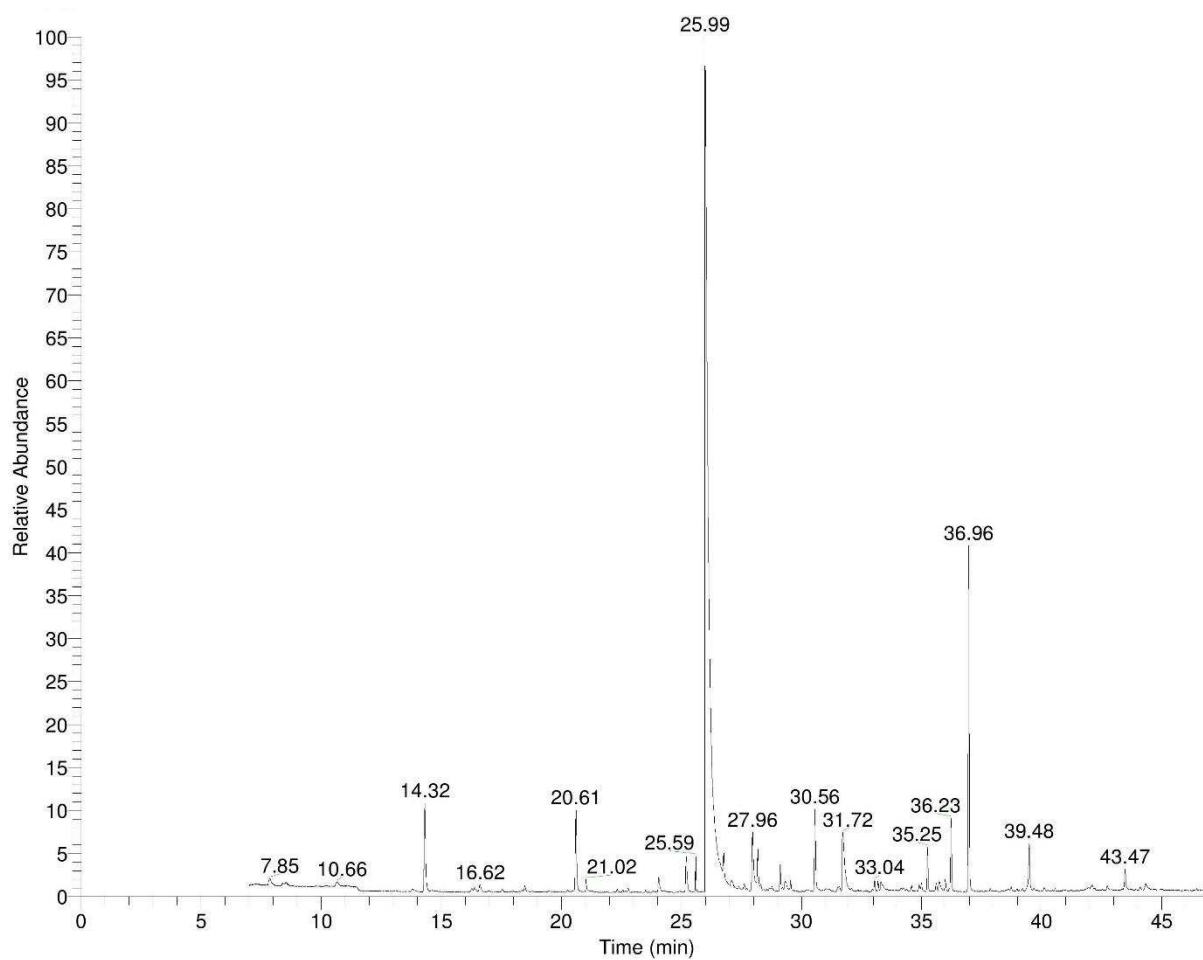
Graf 5: Kalibrační křivka fenolických látek



Obrázek 10: GC chromatogram těkavých látek v bezových výliscích



Obrázek 11: GC chromatogram těkavých látek v extraktu bezových výlisků



Obrázek 12: GC chromatogram těkavých látek v koncentrátu z extraktu bezových výlisků