

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Brno, 2019

Bc. Lucie Sedláčková



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

MOŽNOST DALŠÍHO VYUŽITÍ BEZINKOVÝCH VÝLISKŮ

POSSIBILITY OF FURTHER USE OF ELDERBERRY MARC

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Lucie Sedláčková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1314/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Lucie Sedláčková**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Možnost dalšího využití bezinkových výlisků

Zadání diplomové práce:

Teoretická část:

- 1) Biologicky aktivní látky obsažené v plodech bezu černého (*Sambucus nigra* L.)
- 2) Využití bezinek v potravinářství
- 3) Popis instrumentace HPLC
- 4) Rešerše stanovení anthokyanů

Experimentální část:

- 1) Optimalizace extrakce bezinkových výlisků
- 2) Zakoncentrování získaného extraktu
- 3) Stanovení charakteristických vlastností výsledného koncentráту
- 4) Zpracování získaných dat a vyhodnocení výsledku

Termín odevzdání diplomové práce: 17.5.2019:

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

Bc. Lucie Sedláčková
student(ka)

RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá přípravou koncentráту a lyofilizátu z extraktu bezových výlisků (bez černý, *Sambucus nigra L.*) a stanovením vybraných chemických charakteristik v těchto produktech.

Teoretická část obsahuje botanickou charakteristiku rostlinného druhu *Sambucus nigra L.*. Dále je část věnována biologicky aktivním látkám obsaženým v černém bezu a možnostem využití bezu v potravinářství. Je také obecně popsána extrakce, purifikace a identifikace anthokyanových barviv. V další části je popsána analytická metoda HPLC včetně popisu instrumentace. Poslední kapitola je věnována popisu použitých metod: metody k zakoncentrování extraktu, UV-VIS spektrofotometrie, stanovení fenolických látek, stanovení sušiny, stanovení aktivní kyselosti a celkové titrační kyselosti.

V experimentální části byl optimalizován postup výroby extraktu z bezových výlisků. Získaný extrakt byl zahuštěn pro následné uchování a byl charakterizován na základě vybraných chemických vlastností. Hlavním parametrem kvality extraktu byl celkový obsah anthokyanových barviv.

Nejvhodnějším postupem pro přípravu extraktu byl stanoven poměr výlisků a rozpouštědla 1:2,4 (m/V), nejvhodnějším rozpouštědlem byla směs vody a ethanolu v poměru 1:1 (V/V). Podle požadavků zadavatele byl připraven také extrakt za použití vody jako extrakčního činidla. Připravený extrakt byl pro následné uchování zahušťován na vakuové odparce nebo lyofilizován.

Degradace barviv při použití odparky byla nejnižší při teplotě vodní lázně 40 °C. Finální produkty byly charakterizovány stanovením rozpustné sušiny, pH, titrační kyselosti, celkových fenolických látek a celkových anthokyanových barviv. Kapalinovou chromatografií byly identifikovány obsažené anthokyanové pigmenty: kyanidin-3-sambubiosid, kyanidin-3-glukosid, kyanidin-3-sambubiosid-5-glukosid a kyanidin-3,5-diglukosid. Celkový obsah anthokyanů byl v koncentráту stanoven jako ekvivalent kyanidinu-3-glukosidu na 2,8 g·l⁻¹ a v lyofilizátu 2,5 g·l⁻¹.

KLÍČOVÁ SLOVA

Bez černý (*Sambucus nigra L.*), extrakce, zakoncentrování, lyofilizace, anthokyanová barviva, fenolické látky, rozpustná sušina, pH, titrační kyselost.

ABSTRACT

This Diploma thesis talks about the production of concentrates and lyophilisate from the extract of elderberry moldings (elderberry, *Sambucus nigra L.*) and by determination by chosen chemical characteristics of these products.

The theoretical part includes the botanical characteristics of the plant species *Sambucus nigra L.* Next is the part that is dedicated to biologically active substances found in elderberry and its possible usage in the food industry. Next is the part where the extraction, purification and identification of anthocyanic dyes are described. In the next part is the analytical method HPLC described, including the description of instrumentation. The last part talks about the description of the used methods: methods for the concentration of the extract, UV-VIS spectrophotometry, determination of phenolic compounds, determination of dry matter, determination of active acidity and the overall titrating acidity.

The experimental part contained the optimization of the process of producing the extract from elderberry moldings. The extract obtained was then concentrated for preservation and characterization purposes based on selected chemical properties. The total content of anthocyanin dyes was chosen as a quality parameter.

The most suitable process for the preparation of the extract was chosen to be the ratio of moldings and solvent 1:2, 4 (m/V). The most suitable solvent was chosen to be a mixture of water and ethanol in a ratio of 1:1 (V/V). According to the needs of the submitter, an extract with the use of water as the extraction agent is also provided. The prepared extract was then concentrated on a vacuum evaporator or lyophilized for storage purposes.

The dye degradation while using the evaporator was the lowest in a 40 ° C water bath. The final products were characterized by the determination of soluble solids, pH, titration acidity, total phenolic compounds and total anthocyanin dyes. The anthocyanin pigments contained identified by liquid chromatography are: cyanidine-3-sambubioside, cyanidine-3-glucoside, cyanidine-3-sambubioside-5-glucoside, and cyanidine-3,5-diglucoside. The total content of anthocyanins in the concentrate was determined to be equivalent to cyanidine-3-glucoside at 2.8 g·l⁻¹ and in the lyophilisate 2.5 g·l⁻¹.

KEY WORDS

Elderberry (*Sambucus nigra L.*), extraction, concentration, lyophilization, total anthocyanins, phenolic substances, soluble solids, pH, titrating acidity

SEDLÁČKOVÁ, Lucie. *Možnost dalšího využití bezinkových výlisků* [online]. Brno, 2019 [cit. 2019-05-17]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113268>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Milena Vespalcová.

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

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí bakalářské práce RNDr. Mileně Vespalcové, Ph.D. za podporu, cenné rady a odborné vedení při zpracování práce.

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1	Bez černý	10
2.1.1	Botanická charakteristika	10
2.1.2	Stanoviště a rozšíření	11
2.1.3	Odrůda Haschberg	11
2.2	Biologicky aktivní látky obsažené v plodech bezu černého	11
2.2.1	Sacharidy	12
2.2.2	Organické kyseliny	12
2.2.3	Vitaminy a esenciální prvky	13
2.2.4	Fenolické látky	13
2.2.5	Toxické látky	19
2.3	Využití bezu černého nejen v potravinářství	20
2.4	Extrakce, purifikace a identifikace anthokyanů	20
2.4.1	HPLC analýza anthokyanů	21
2.4.2	Kapilární elektroforéza (CE) anthokyanů	22
2.4.3	Stanovení celkových anthokyanových barviv pH diferenciální metodou	22
2.5	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	23
2.5.1	Princip kapalinové chromatografie	23
2.5.2	Retenční charakteristiky	24
2.5.3	Typy kapalinové chromatografie	25
2.5.4	HPLC instrumentace	27
2.6	Použité metody	32
2.6.1	Metody k zakoncentrování extraktů	32
2.6.2	UV-VIS spektrofotometrie	33
2.6.3	Stanovení fenolických látek podle Folin-Ciocalteua	34
2.6.4	Stanovení sušiny	35
2.6.5	Stanovení aktivní kyselosti a celkové titrační kyselosti	36
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	37
3.1	Původ rostlinného materiálu	37

3.2	Laboratorní vybavení.....	37
3.2.1	Přístroje	37
3.2.2	Pomůcky.....	37
3.2.3	Chemikálie	38
3.3	Příprava extraktů z výlisků bezu černého vybranými postupy	38
3.3.1	Úprava výlisků před extrakcí	38
3.3.2	Extrakce suchých bezových výlisků	39
3.4	Stanovení zbytkové vlhkosti výlisků usušených při 40 °C.....	39
3.4.1	Příprava vzorků a vlastní měření.....	39
3.4.2	Výpočet	39
3.5	Příprava koncentrátů z extraktu bezových výlisků.....	39
3.6	Lyofilizace extraktu z bezových výlisků	40
3.7	Stanovení celkových anthokyanových barviv pH diferenciální metodou	40
3.7.1	Příprava roztoků	40
3.7.2	Příprava vzorků a samotné měření	41
3.7.3	Výpočet	41
3.8	Refraktometrické stanovení rozpustné sušiny	41
3.8.1	Výpočet	42
3.9	Stanovení celkových fenolických látek metodou podle Folin-Ciocalteua	42
3.9.1	Příprava roztoků	42
3.9.2	Kalibrační řada	42
3.9.3	Příprava vzorků a samotné měření	42
3.9.4	Výpočet	43
3.10	Stanovení pH a titrovatelných kyselin	43
3.10.1	Příprava roztoků	43
3.10.2	Příprava vzorků a samotné stanovení.....	44
3.10.3	Výpočet	44
3.11	Stanovení anthokyanových barviv kapalinovou chromatografií	44
3.11.1	Příprava mobilní fáze	44
3.11.2	Separace vzorků	45
3.11.3	Kalibrační křivka.....	45

3.12	Statistické zpracování naměřených dat	46
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	47
4.1	Stanovení zbytkové vlhkosti ve vyliscích vysušených při 40 °C	47
4.2	Optimalizace extrakce anthokyanových barviv z vylisků bezu černého	47
4.3	Optimalizace teploty vodní lázně při přípravě koncentrátů na vakuové odparce.....	49
4.4	Příprava koncentrátů, lyofilizátů a stanovení vybraných chemických charakteristik	51
4.4.1	Stanovení refraktometrické sušiny	53
4.4.2	Stanovení aktivní kyselosti a titrační kyselosti	54
4.4.3	Stanovení celkového obsahu fenolických látek	56
4.4.4	Stanovení celkových anthokyanů pH diferenciální metodou.....	57
4.4.5	HPLC analýza anthokyanových barviv	58
5	ZÁVĚR.....	65
7	ZDROJE	67
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	74
9	SEZNAM PŘÍLOH	75
10	PŘÍLOHY.....	76

1 ÚVOD

Bez černý (*Sambucus nigra L.*) patří mezi vysoce hodnotné drobné bobulové ovoce, které obsahuje mnoho rostlinných antioxidantů. Je významným zdrojem fenolických látek a mnoha dalších nutričně významných látek. Fenolické sloučeniny patří k nejúčinnějším přírodním látkám působícím proti volným radikálům. Mezi fenolické látky patří, mimo jiné, skupina anthokyanových barviv. Tyto pigmenty jsou zodpovědné za červené až fialové zbarvení bezových plodů. Používají se také jako přírodní potravinářská barviva mající pozitivní vliv na lidské zdraví a jako potravinářská aditiva se označují kódem E163.

Bezová šťáva je přidávána do širokého spektra potravinářských výrobků. Vedlejší produkt při průmyslovém zpracování plodů bezu jsou výlisky, které se obvykle dále nevyužívají, pouze kompostují. Tyto výlisky však obsahují poměrně velké množství barviv, které je možné relativně jednoduše z výlisků extrahovat a dále využít jako přírodní barvivo do potravin.

Tato práce je proto zaměřena jednak na ověření, případně optimalizaci extrakce anthokyanových barviv z výlisků bezu černého. Dalším úkolem je zakoncentrování připraveného extraktu vakuovou odparkou a příprava lyofilizátu z extraktu. Připravené koncentráty a lyofilizáty byly charakterizovány stanovením vybraných chemických vlastností biologicky aktivních látek.

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

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Bez černý

Taxonomické zařazení [1]

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

2.1.1 Botanická charakteristika

Černý bez (*Sambucus nigra L.*) je rychle rostoucí rozkladitý keř až strom dorůstající výšky až 7 m. Starší větve a kmeny mají šedohnědou až šedou rozpukanou kůru, mladé větve mají širokou bílou dřev. Vstřícné listy jsou lichozpeřené, většinou s pěti vejčité podlouhlými, jemně pilovitými lístky. Květy tvořící široké ploché vrcholíky jsou drobné smetanově bílé se žlutými prašníky. Vykvétají postupně od konce května až do začátku července. Plodem jsou lesklé černé až černofialové peckovičky známé jako bezinky, měří 6–8 mm a obsahují tři chrupavčité pecky. Sběr plodů bezu se provádí v září až říjnu, každoroční sklizní lze dosáhnout výtěžku až 250 kg ovoce na jedné rostlině [2, 3, 4].



Obrázek 1: bez černý [6]

2.1.2 Stanoviště a rozšíření

Černý bez má svůj původ v Evropě, ale roste i v Austrálii, Jižní Americe, Severní Africe, ale i v západní a střední Asii. V České republice se komerčně do nedávna černý bez nepěstoval. Až na výjimky jsou plody bezu v ČR sbírány spíše z planě rostoucích dřevin.

Bez černý nevyžaduje příliš specifické půdní ani klimatické podmínky k růstu. Vyhýbá se však vápenitým půdám a vyhledává půdy dusíkaté, vlhké a bohaté na humus. Nejlépe se bezu daří ve vlhkých lesnatých půdách, ale je možné jej najít i na kamenitých místech, zarostlých křovích a kolem vodních toků. Rostlina je odolná proti mrazu, vzhledem k době kvetení (konec května, počátek června) jsou vyloučeny mrazové škody v květu [4, 7].

2.1.3 Odrůda Haschberg

Odrůda Haschberg má svůj původ v Rakousku, kde byla vypěstována v roce 1965. Jedná se o jednu z nejstarších a zároveň nejrozšířenějších odrůd bezu černého v pěstitelských systémech v Evropě. Vyznačuje se velmi nízkou náchylností k různým onemocněním a k napadení škůdci. Rostlina této odrůdy dorůstá do výšky dvou metrů. Kvete až od počátku června, takže ji neohrožují pozdní mrazíky. Odrůda je odolná i proti silným dešťům, které ji nijak nepoškozují. Pro docílení požadované cukernatosti a zastoupení barviva vyžaduje teplejší průběh vegetační sezony. Plody jsou černé barvy se značným obsahem barviv. Odrůda vyniká vysokou plodností [4, 5].



Obrázek 2: plody odrůdy Haschberg [16]

2.2 Biologicky aktivní látky obsažené v plodech bezu černého

Plody bezu černého mají velmi vysoké množství léčivých a lidskému zdraví prospěšných přírodních látek. Poměrně vysoký obsah bioaktivních sloučenin v bezu černém je důvodem pro rostoucí zájem o tuto plodinu. Množství antioxidantů anthokyanové a fenolové struktury, bílkoviny, cukry, organické kyseliny, vitamin A, vitamin C dělá z bezu cennou surovinu pro biotechnologii, potravinářskou technologii a farmacii [7, 8].

Plody obsahují relativně malé množství cukrů v kombinaci s vysokými koncentracemi organických kyselin. Jsou bohatým zdrojem anthokyanů na bázi kyanidinu, převážně kyanidinového 3-sambubiosidu, ale také kyanidin-3-sambubiosid-5-glukosid, kyanidin-3,5-diglukosid a kyanidin-3-glukosid, jiné anthokyaniny jsou přítomné ve stopových množstvích. Z fenolových kyselin je nejvíce zastoupená kyselina chlorogenová a její deriváty. Plody jsou bohatým zdrojem flavonolů například kvercetinů. Dále jsou v plodech obsaženy terpeny, lekniny, volné i konjugované aminokyseliny, nenasycené mastné kyseliny, frakce vlákniny, vitaminy a minerály [8, 9].

V potravinářské technologii a medicíně je využití těchto plodů limitované obsahem kyanoglykosidů nebo kyanolipidů. Obsah toxických látek může minimalizovat správné načasování sklizně nebo tepelné ošetření plodů [8].

2.2.1 Sacharidy

Plody černého bezu obsahují 7,86–11,50 % celkových sacharidů a z toho 2,8–8,55 % cukrů. Nejvíce zastoupenými cukry v plodech bezu jsou fruktosa (33,99–52,25 g·kg⁻¹ FW) a glukosa (33,33–50,23 g·kg⁻¹ FW). Sacharosa (0,47–1,68 g·kg⁻¹ FW) je obsažena v nízkých množstvích. Sacharidy v bezu černém zahrnují také vlákninu, pektin, propektin a celulozu [10, 19].

Tabulka 1: koncentrace jednotlivých cukrů v plodech odrůdy Haschberg v g·kg⁻¹ FW

	sacharosa	fruktosa	glukosa	celkem
koncentrace	1,21 ± 0,06	33,99 ± 0,93	33,33 ± 0,67	68,53 ± 1,55

Koncentrace celkových cukrů v plodech bezu černého odrůdy Haschberg je 68,53 g·kg⁻¹ což je přibližně srovnatelné s plody višni 90 g·kg⁻¹. Výrazně odlišný je obsah cukrů u jablek 115–183 g·kg⁻¹ a u třešní 150–230 g·kg⁻¹.

Nízký obsah cukrů v bobulích ovoce není však pro potravinářské zpracování velkým problémem, jelikož je fruktosa a sacharosa do finálních výrobků přidává (džusy, koncentráty, nápoje) [10].

2.2.2 Organické kyseliny

Plody bezu černého obsahují kyseliny citronovou, jablečnou, šikimovou a kyselinu fumarovou. Nejvíce je zastoupena kyselina citronová 4,81 g·kg⁻¹ což je oproti jablku 0,07–0,52 g·kg⁻¹, třešni 0,11–0,54 g·kg⁻¹ a višni 0,08–0,14 g·kg⁻¹ poměrně vysoká hodnota, která je důležitým parametrem při zpracování tohoto ovoce [10].

Tabulka 2: koncentrace organických kyselin v černém bezu odrůdy Haschberg v g·kg⁻¹ FW

	citronová	jablečná	šikimová	fumarová	celkem
koncentrace	4,81 ± 0,19	1,10 ± 0,04	0,18 ± 0,04	0,290 ± 0,001	6,38 ± 0,26

2.2.3 Vitaminy a esenciální prvky

Bez černý obsahuje řadu vitamínů. Majoritním vitamínem je vitamin C. Jeho obsah závisí na kultivaru a lokalitě ve které rostlina roste. Literatura udává obsah vitaminu C na 6–25 mg na 100 g ovoce [19, 20].

Tabulka 3: obsah vitamínů ve 100 g plodů černého bezu

A (μg)	B1 (mg)	B2 (mg)	Niacin (mg)	B6 (mg)	Kyselina listová (μg)	Kyselina pantothenová (mg)	Biotin (μg)	C (mg)
60	0,07	0,08	1,48	0,25	17	0,18	1,80	18

Esenciální prvky jsou takové minerální látky, které organismus musí přijímat v potravě v určitém množství, aby byly zajištěny důležité biologické funkce. Majoritní minerální prvky v bezu černém jsou sodík, draslík, vápník a hořčík. Dále stopové prvky chrom, kobalt, mangan, měď, zinek, železo, nikl a vanad [7].

Tabulka 4: obsah minerálních prvků v 1 l šťávy bezu černého [7]

	Na (mg)	K (g)	Ca (μg)	Mg (μg)	Cr (μg)	Mn (mg)	Cu (μg)	Zn (mg)	Fe (μg)	Ni (μg)
Haschberg	4,70	2,50	268	129	147	3,20	224	1,01	423	91
Planý bez	9,92	1,39	255	301	352	1,96	909	1,93	193	168

2.2.4 Fenolické látky

Fenolické sloučeniny jsou sekundární metabolity rostlin a hub. Tyto sloučeniny jsou v rostlinách pro ochranu před UV zářením, hmyzem, viry a bakteriemi. Některé druhy rostlin využívají fenolické sloučeniny k potlačení růstu jiných rostlinných konkurentů (alelopatie). Příkladem takových fenolických látek s tímto účinkem jsou kyseliny kávová a ferulová. Obsah fenolických látek v plodech je ovlivněn stupněm zralosti při sklizni, kultivarem, podmínkami pěstování, skladováním a zpracováním [11, 12].

Fenolické látky se skládají z jednoho nebo více aromatických kruhů s různými stupni hydroxylace, methoxylace a glykosylace, což přispívá k barvě a hořkosti ovoce. V plodech bobulovitého ovoce se nacházejí zejména fenolové kyseliny, flavonoidy, tanniny a stilbeny [13].

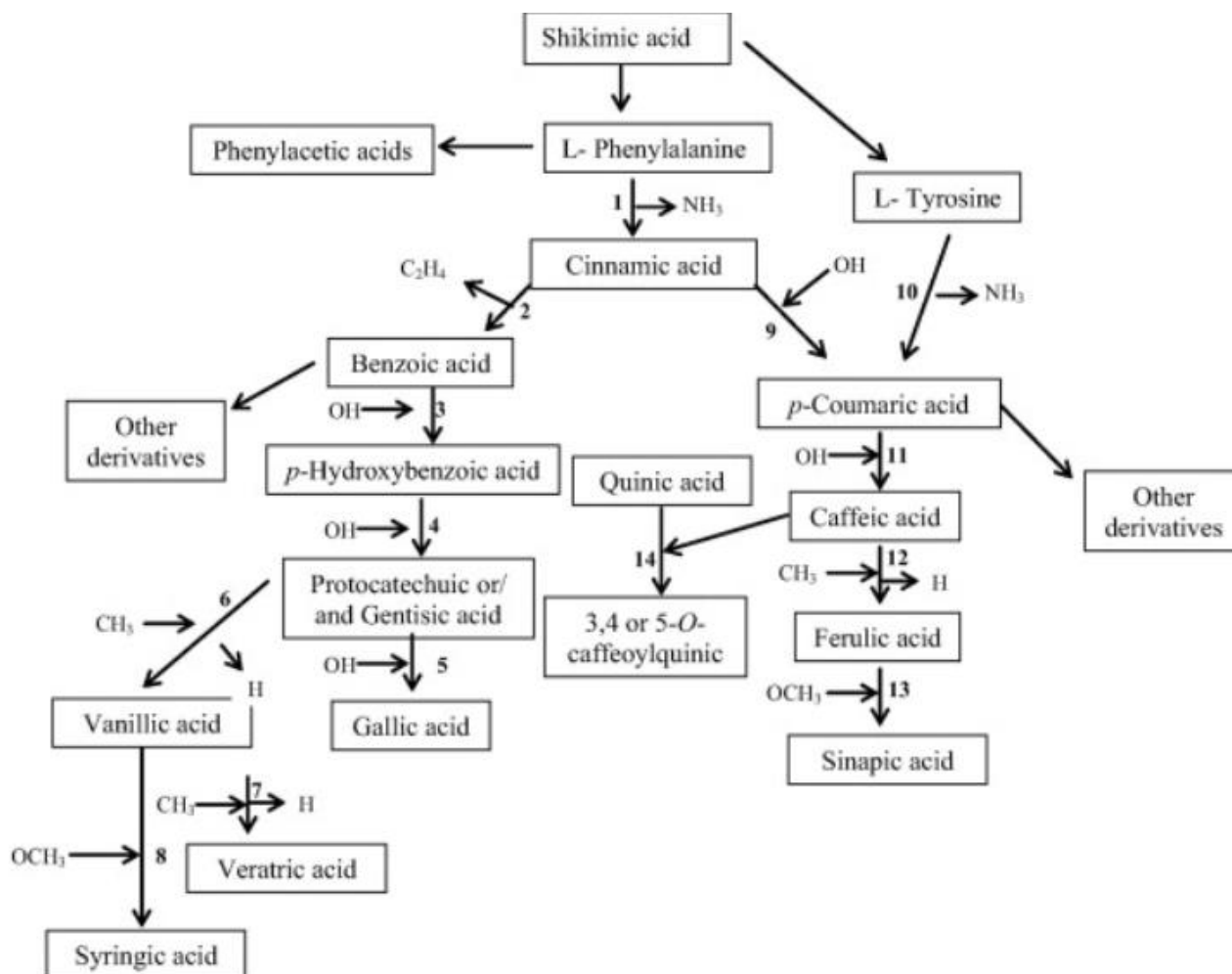
Obsah celkových fenolických látek v plodech bezu černého je 364–582 mg GAE na 100 g FW [19].

2.2.4.1 Fenolické kyseliny

Fenolické kyseliny lze rozdělit do dvou skupin: deriváty odvozené od kyseliny benzoové a deriváty odvozené od kyseliny skořicové. Obsahují alespoň jeden aromatický kruh, přičemž aspoň jeden atom vodíku je nahrazen hydroxylovou skupinou. V ovoci se vyskytují převážně

vázané, volné fenolické kyseliny se vyskytují jen zřídka, většinou maximálně 5 % z celkového objemu fenolických kyselin [11, 13].

Fenolové kyseliny se syntetizují z L-fenylalaninu nebo L-tyrosinu ze šikimátové dráhy. Fenylalanin a tyrosin jsou velmi důležité aminokyseliny, protože jsou běžnými prekurzory pro většinu přírodních fenolických látek [11].

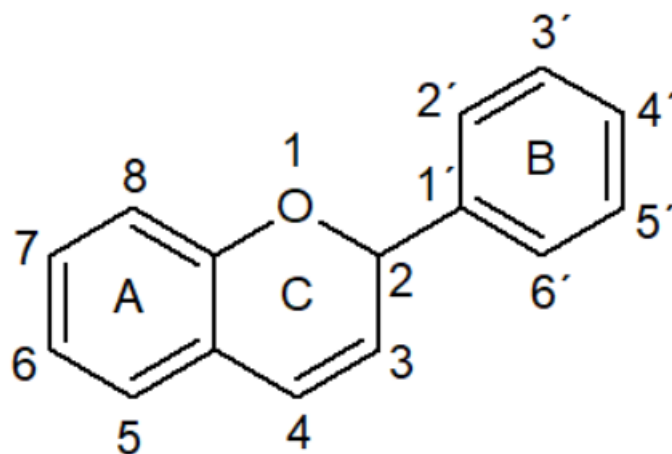


Obrázek 3: dráha produkující fenolické látky [11]

Nejvíce zastoupenou kyselinou v plodech černého bezu je kyselina chlorogenová a její deriváty, dále také neochlorogenová kyselina a kyselina kryptochlorogenová [9, 17, 19].

2.2.4.2 Flavonoidy

Flavonoidní látky jsou rozsáhlou skupinou fenolů v rostlinách. Jejich molekula obsahuje dva benzenové kruhy spojené tříuhlíkovým řetězcem. Základní strukturou flavonoidů je flavan, který obsahuje dva aromatické kruhy propojené kyslíkatým heterocyklem se třemi uhlíkatými atomy. Podle stupně oxidace C3 řetězce se rozlišují základní struktury: katechiny, leukoanthokyanidiny, flavanony, flavanonoly, flavony, flavonoly a anthokyanidiny [13, 14].



flavan

Černý bez je bohatým zdrojem flavonolů. Nejběžnějším flavonolem je rutin (kvercetin 3-rutinosid), dále je v plodech bezu významně obsažen kvercetin, isokvercetin a kaempferol [9, 17].

Tabulka 5: průměrný obsah vybraných flavonolů a kyseliny chlorogenové v bezu černém odrůdy Harchberg pro různé vegetační období. Deriváty odvozené od kyseliny skořicové jako mg kyseliny chlorogenové na 100 g bobulí a flavonolové jako mg rutinu na 100 g plodů [22]

	Haschberg 2004	Haschberg 2005
Kyselina neochlorogenová	0,7 ± 0,1	0,9 ± 0,2
Kyselina chlorogenová	28,1 ± 2,5	34,7 ± 5,4
Kyselina kryptochlorogenová	1,6 ± 0,2	1,9 ± 0,3
Rutin	72,7 ± 8,9	95,6 ± 9,5
isokvercetin	3,9 ± 0,4	5,2 ± 0,3
Kaempferol 3-rutinosid	0,7 ± 0,1	1,2 ± 0,1
Isorhamnetin 3-rutinosid	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1
Isorhamnetin 3-glukosid	0,1 ± 0,1	-
Celkové fenolické látky	108,5 ± 9,6	140,3 ± 10,4

Tabulka 6: koncentrace kvercetinů v plodech bezu černého odrůdy Haschberg a Rubini (mg CGE na 100 g FW) [10]

	Kvercetin	Kvercetin-3-rutinosid (rutin)	Kvercetin-3-glukosid	Celkem
Haschberg	2,89 ± 0,46	52,02 ± 2,48	6,38 ± 0,37	61,29 ± 2,79
Rubini	4,50 ± 0,13	35,88 ± 0,89	26,52 ± 0,57	66,90 ± 1,49

2.2.4.3 Tanniny

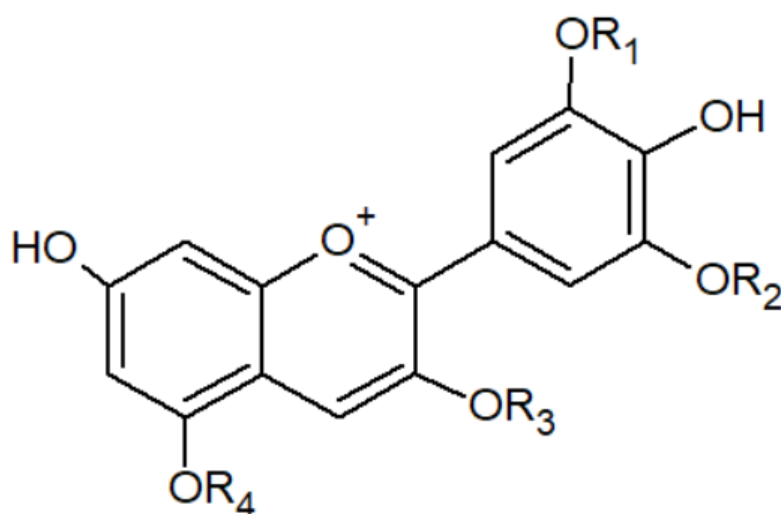
Tanniny se rozdělují na hydrolyzované a kondenzované. Hydrolyzované tanniny jsou vícenásobné estery kyseliny gallové nebo kyseliny ellagové s vázanou glukosou. Produkty jejich oxidačních reakcí se nazývají gallotanniny a ellagotanniny [13]. Kondenzované tanniny (třísloviny) neboli proanthokyanidiny jsou rozmanité oligomery nebo polymery flavonoidních látek se strukturou flavanu. Oligomery vzniklé kondenzací 2–10 flavanových jednotek s molekulovou hmotností kolem 5 kDa mají svíravou hořkou chuť. Polymery s molekulovou hmotností až do 400 kDa chuťové vlastnosti tříslovin nemají, ale jsou důležité při tvorbě zákalů a sedimentů vína, piva a ovocných šťáv [14].

Plody bezu černého obsahují malé množství tříslovin s nízkým kondenzačním stupněm, je to epikatechin (88,4 % celkových taninů), katechin (11,6 % celkových taninů) a jejich thiolové deriváty [19].

2.2.4.4 Anthokyaniny

Anthokyaniny jsou jedním z nejrozšířenějších druhů ve vodě rozpustných přírodních barviv v rostlinné říši. Mohou se vyskytovat v jakékoliv rostlinné tkáni. Vykazují rozmanitou paletu barev, od oranžové až po fialové a modré odstíny. Tyto látky rostlinám pomáhají přitahovat opylovače a účastní se mechanismů obrany rostlin proti stresovým faktorům. Jsou zodpovědné za barvu mnoha druhů ovoce a zeleniny a jsou také považovány v potravinářství za přírodní barviva označované kódem E163, jsou alternativou k syntetickým barvivům. Jsou vhodné pro kyselé potraviny, jelikož mají intenzivní barvu v prostředí o pH menším než 3,5 [7, 9, 15, 14, 21].

Anthokyaniny jsou produkovány větví flavonoidní dráhy a jejich syntéza představuje nejvíce studovanou sekundární metabolickou dráhu u rostlin. V rostlinách se vyskytují jako glykosidy aglykonů, které se nazývají anthokyanidiny. Jsou odvozeny od základní struktury, kterou je flavyliový kation. Volné aglykony anthokyanidiny se vyskytují zřídka, ve všech rostlinných materiálech jsou ve formě glykosidů anthokyanidinů. V potravinách má význam 6 anthokyanidinů: pelargonidin, kyanidin, peonidin, delfinidin, petunidin, malvidin [9, 14].



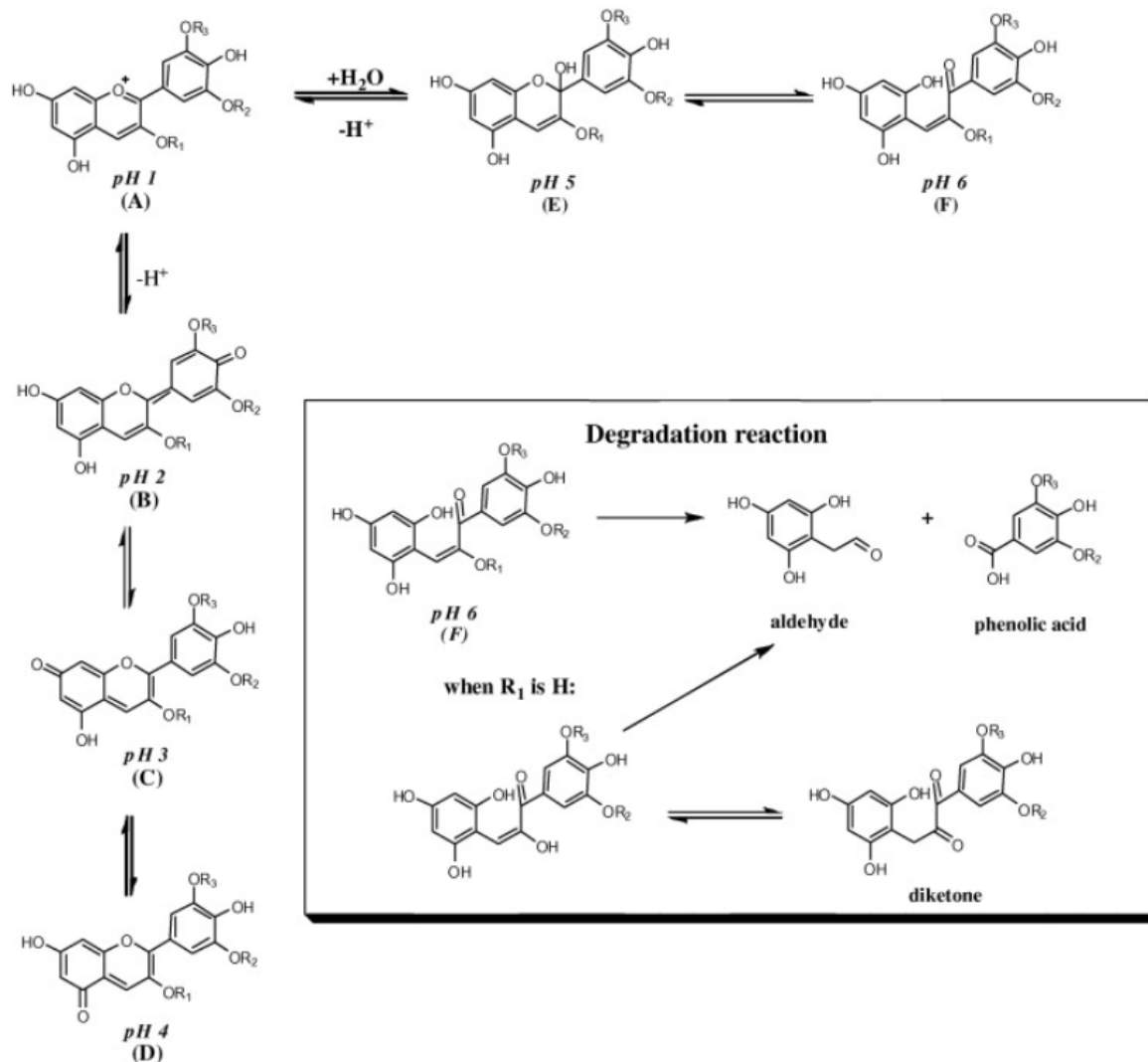
flavyliový kation

Tabulka 7: struktura anthokyanů

Glukosid	R1	R2	R3	R4
Kyanidin 3-glukosid	H	H	glukosa	H
Kyanidin 3-sambubiosid	H	H	sambubiosa	H
Kyanidin 3-sambubiosid-5-glukosid	H	H	sambubiosa	glukosa
Kyanidin 3,5-diglukosid	H	H	glukosa	glukosa
Kyanidin 3-rutinosid	H	H	rutinosa	H

Anthokyaniny jsou velice nestabilní a náchylné k degradaci. Jejich stabilita je ovlivněna několika faktory, jako je chemická struktura, koncentrace, pH, teplota, světlo, kyslík a přítomnost enzymů. Teplota je důležitým faktorem procesu sušení, který může změnit obsah anthokyanů [9, 15].

Anthokyaniny lze nalézt v různých chemických formách, které závisí na pH roztoku. Závislost barvy anthokyanů na pH je způsobena jejich molekulární strukturou a iontovou povahou [24, 25]. Při pH 1 převažuje flavyliový kation (obrázek 4, A), který přispívá k purpurovým a červeným barvám. Při hodnotách pH 2 až 4 převažuje modrá chinoidní struktura (obrázek 4, B až D). Při hodnotách pH mezi 5 a 6 lze pozorovat pouze bezbarvé struktury, kterými jsou pseudobáze karbinolu (obrázek 4, E) a chalkon (obrázek 4, F). Při pH vyšším než 7 jsou anthokyaniny degradovány v závislosti na jejich substitučních skupinách (obrázek 4, degradační reakce) [24].



Obrázek 4: Chemické formy anthokyaninů v závislosti na pH a degradační reakce pro anthokyaniny ($R_1 = H$ nebo sacharid, R_2 a $R_3 = H$ nebo methylová skupina) [24]

Stabilita anthokyaninů je ovlivněna substituenty na kruhu B a přítomností dalších hydroxylových nebo methoxylových skupin, které snižují stabilitu aglykonu v neutrálním prostředí. Podle výzkumů týkajících se stability anthokyanů a barevné variability závislé na pH jsou změny v barvě těchto sloučenin významnější v alkalické oblasti díky jejich nestabilitě [24, 25].

Anthokyanová barviva významně podporují lidské zdraví. Vykazují antioxidační, antibakteriální, antivirotické, antikarcinogenní a imunostimulační účinky. Redukují koronární onemocnění a působí protizánětlivě [7].

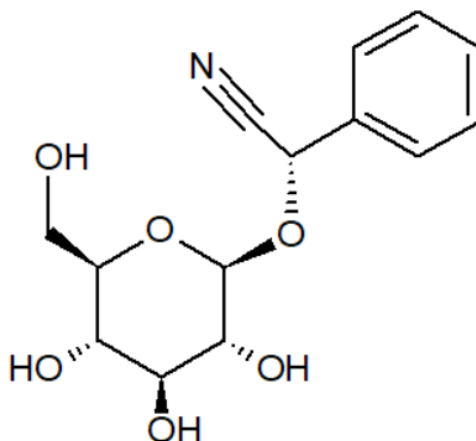
V černém bezu se nachází 5 majoritních anthokyanů: kyanidin 3-sambubiosid-5-glukosid (C3S5G), kyanidin 3,5-diglukosid (C35dG), kyanidin-3-sambubiosid (C3S), kyanidin 3-glukosid (C3G) a kyanidin 3-rutinosid (C3R). Jiné anthokyaniny se vyskytují v nízkých koncentracích. Hlavními anthokyaniny v plodech bezu černého jsou kyanidin-3-sambubiosid a kyanidin-3-glukosid [10, 18].

Tabulka 8: koncentrace anthokyanů v plodech bezu černého odrůdy Haschberg (mg CGE na 100 g FW) [10, 22]

	Haschberg	Haschberg
C3S5G	33,29 ± 1,30	59,20 ± 1,60
C35dG	9,47 ± 1,03	19,50 ± 0,60
C3S	352,70 ± 25,60	268,10 ± 20,60
C3G	331,70 ± 13,00	309,70 ± 18,30
C3R	9,63 ± 0,45	-
Celkové anthokyany	736,70 ± 40,20	656,50 ± 40,70

2.2.5 Toxické látky

Všechny části rostliny černého bezu obsahují kyanogenní glykosidy, z nichž nejrozšířenější jsou sambunigrin a prunasin. Dále obsahuje m-hydroxysubstituované glykosidy, jako je zierin a holokalin. Tyto sloučeniny jsou potenciálně toxické a život ohrožující, protože mohou být hydrolyzovány, což vede k uvolnění kyanidu. Vyskytují se převážně v nezralých bobulích, takže správné načasování sklizně může stejně jako tepelné ošetření plodů minimalizovat množství těchto toxických látek [8,19].



sambunigrin

Tabulka 9: obsah sambunigrinu v různých částech bezu černého [19]

části rostliny	koncentrace ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FW)
starší listy	27,68–209,61
květy	1,23–18,88
plody	0,08–0,77

2.3 Využití bezu černého nejen v potravinářství

Bez černý patří mezi typické zástupce průmyslového ovoce. Plody obsahují látky, které v podstatě znemožňují jejich konzumaci v syrovém stavu. V potravinářství se využívají především plody, ale i květy pro výrobu nápojů. Značné využití nacházejí bezinky i květy ve farmaceutickém průmyslu, kde se zpracovávají nejen jako komponent čajových směsí, ale také na sirupy a doplňky stravy [5].

Vzhledem k tomu, že je černý bez bohatý na anthokyany, patří k několika druhům drobného ovoce, jehož šťáva se používá jako barvivo v různých průmyslových odvětvích. Koncentrát z bezové šťávy se používá zejména jako potravinářské barvivo, přísada do léčiv, koncentrátů, džusů, sirupů, džemu, želé, prášků a jiných potravinových výrobků, používá se také pro výrobu zákusků nebo dezertů a pro výrobu alkoholických nápojů jako je víno. Výlisky, které jsou vedlejším produktem výroby šťávy se využívají pro výrobu anthokyanových extraktů a lyofilizovaných barviv. Výlisky se také používají jako krmivo pro zvířata a jako organická hnojiva.

Květy bezu černého jsou podobně jako plody široce využívány v potravinářském průmyslu jako přírodní aromatické složky alkoholických nápojů, čajů a dalších výrobků jako jsou jogurty nebo zmrzliny [19].

V lidovém léčitelství se bez používá při léčbě mnoha onemocnění, zejména při nachlazení a chřipce, ale také pro léčbu popálenin, otoků, kožních vyrážek, kousnutí hmyzem a při revma. Tradiční medicína doporučuje konzumovat bez černý hlavně při respiračním onemocnění, jako je chřipka a nachlazení, ale také jako diaforetikum, diuretikum, projímadlo a proti zánětům. Léčivé vlastnosti bezu černého jsou spojené s obsahem polyfenolů, které mají potenciální antioxidační vlastnosti. Mohou významně ovlivnit průběh choroboplodných procesů tím, že budou působit proti oxidativnímu stresu, příznivě působí na krevní tlak, redukuje glykémii, stimulují imunitní systém a mají protinádorový potenciál [23].

2.4 Extrakce, purifikace a identifikace anthokyanů

Extrakce rozpouštědlem je nejběžnější metodou extrakce různých sloučenin, které se nacházejí v ovoci, včetně flavonoidů. Fenolové sloučeniny se dají extrahovat z mletého, sušeného, lyofilizovaného nebo čerstvého ovoce. Anthokyany jsou polární molekuly, takže nejběžnější rozpouštědla použitá pro extrakci jsou vodné směsi ethanolu, methanolu nebo acetonu. Tyto metody zahrnují koextrakci nefenolických látek, jako jsou cukry, organické kyseliny a proteiny, vyžadují tedy následné čistící procesy [24].

Pro extrakci anthokyanových barviv se tradičně používají okyselená organická rozpouštědla jako je methanol a ethanol. Bohužel organická rozpouštědla jsou potenciálně toxická a drahá pro průmyslové využití v potravinářství. Využití vody jako extrakčního rozpouštědla tyto problémy obchází a voda může poskytnout přirozený prostředek pro izolaci anthokyanů z ovoce, zejména pokud je zlepšena účinnost extrakce. Je prokázáno, že zvýšení extrakční teploty nebo přidání oxidu siřičitého do vody zlepšuje účinnost extrakce. Zvýšení extrakční teploty usnadňuje uvolňování fenolických látek z rostlinných matic, zvyšuje rychlost rozpouštění fenolických látek v rozpouštědle a zvyšuje rychlost extrakce a zkracuje dobu

extrakce. Teplota extrakce vyšší než 70 °C však může způsobit rychlou degradaci a odbarvení anthokyanů. Anthokyanové pigmenty mohou být také extrahovány vodou s přidaným oxidem siřičitým pro stabilizaci struktury anthokyanu vznikem stabilního bisulfitového komplexu a pro zvýšení difúzního koeficientu molekul anthokyanu přes pevnou látku. To zvyšuje propustnost anthokyanu z rostliny během extrakce vodou. Jako vysoce účinná technika pro extrakci anthokyanů z ovoce je považována subkritická extrakce na bázi vody. Tato extrakční technika využívá okyselenou vodu (0,01% HCl) ohřátou na teploty 110–160 °C, pod konstantním tlakem 40 barů [25, 26, 27].

Používané extrakční metody nejsou selektivní pro anthokyany, protože jsou schopny koextrahovat velké množství dalších sloučenin, jako jsou cukry a organické kyseliny. V důsledku toho je nezbytné zavést další purifikační techniky [24]. V tomto smyslu bylo navrženo široké spektrum technik. Využívá se extrakcí v pevné fázi a extrakci kapalina-kapalina. Extrakce pevnou fází se běžně provádí v patronách plněných sorbentem C18 nebo Sephadexem, ve kterých jsou anthokyany silně vázány prostřednictvím hydroxylových skupin. V následném kroku jsou odděleny od jiných sloučenin zvýšením polaritu elučního rozpouštědla. Separace a identifikace anthokyanů může být prováděna různými chromatografickými metodami, jako je protiproudá chromatografie, středotlaká kapalinová chromatografie a vysoce účinná chromatografie. Pro separaci anthokyanových směsí se také používá sloupcová chromatografie na celulóze, nicméně přítomnost velkého množství jiných látek může způsobovat problémy. Čištění anthokyaninů prováděné protiproudou chromatografií je velmi drahé, v poslední době se pro purifikaci používají makroporézní adsorpční pryskyřice [24, 26, 27].

2.4.1 HPLC analýza anthokyanů

Není možné popsat jediný standardní postup, jelikož si každá laboratoř vyvíjí analytickou metodu podle specifických požadavků separace.

Nejpopulárnější metodou pro separaci a kvantifikaci anthokyanů je vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detektory UV-VIS nebo fotodiodovými poli (PDA). Toto pole se využívá ke stanovení UV-VIS spektrálních charakteristik pigmentů. Některé rozdíly v UV-VIS spektru mohou být použity k rozlišení anthokyanů od derivátů. Detekce hmotnostní spektrometrie spojená s HPLC umožňuje rychlou a jednoznačnou identifikaci anthokyanů ve vzorku, protože HPLC-MS kombinuje separaci chromatografie se selektivitou a citlivostí detekce hmotnostní spektrometrie.

Jako náplně kolon se k tomuto účelu nejčastěji používají reverzní fáze. Separací charakteristiky na C18 kolonách od různých výrobců se liší. Separace strukturně podobných fenolických sloučenin se provádí gradientovou elucí. Jako mobilní fáze se používá okyselená voda s methanolem nebo acetonitrilem. Hodnota pH mobilní fáze se udržuje pod 2 přidáním malého množství kyseliny mravenčí nebo octové, aby se zabránilo rozmytí píků, které je způsobeno interkonverzí mezi červeným flavyliovým kationtem a modrým chinoidním kruhem.

Polarita aglykonů je nejdůležitějším faktorem ovlivňujícím retenční časy separovaných analytů. Za obvyklých podmínek je pořadí eluce: deriváty delfininu, kyanidinu, petunidinu, pelargonidinu, peonidinu a malvidinu. Retence se snižuje s rostoucí polaritou (zvýšený počet

kydroxylových skupin ve flavyliovém jádře). Přítomnost cukrů zvyšuje retenci anthokyanů, přičemž diglukosidy jsou eluovány před monoglykosidy [29, 32].

2.4.2 Kapilární elektroforéza (CE) anthokyanů

CE je relativně nový analytický nástroj, který má vynikající citlivost, vysoké rozlišení, nízkou spotřebu vzorku a rozpouštědla. Použití CE pro separaci anthokyanů je poměrně nové, vzácné a slibné vzhledem k vysoké rozpustnosti těchto barviv ve vodě. CE je vhodná technika pro separaci anthokyanů, jejich identifikaci a kvantifikaci [30,31].

První analýza anthokyanů kapilární elektroforézou byla popsána v roce 1996 (Bridle et al.). Studie uvádí separaci směsi standardů a separaci anthokyanů jahod a černého bezu kapilární zónovou elektroforézou. V této studii byla použita kapilární trubice z taveného oxidu křemičitého, boritanový pufr o pH 8 a detektor PDA. Vzhledem k nestabilitě anthokyanů při bazickém pH bylo rozlišení a citlivost metody velmi nízké. Autoři byli schopni získat výsledky pouze pro vysoké koncentrace anthokyanů [30].

Jiná varianta CE byla použita pro kvantitativní stanovení anthokyanů ve víně jako alternativa k HPLC. Studie byla provedena s použitím kapiláry z křemenného skla a $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ pufru při pH 8,4. Uvedený základní elektrolyt byl modifikován 15% methanolem. V této studii bylo dosaženo lepších výsledků než ve studii z roku 1996, protože byly vzorky před separací zakonzentrovány [30,32].

Watanabe a kol. analyzovali pigmenty černého bezu v komerčních vzorcích potravin, jako například v bonbonech, šťávách a želé, pomocí micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC). Analyzované anthokyaniny byly všechny derivátem kyaninu, bylo separováno současně 6 sloučenin. Při kyselém pH pigmenty bezu černého vykazují maximum absorbance při 510 nm, toto maximum se posune na 560 nm při neutrálním pH, což je detekční vlnová délka použitá v analýze MEKC. Ve fosfátborátovém pufru o pH 7,0 byl micelačním činidlem dodecylsulfát sodný. Vysoká koncentrace boritanu byla důležitá pro oddělení diastereomerních párů jako jsou malvidin-3-glukosid a malvidin-3-galaktosid [30, 31, 33].

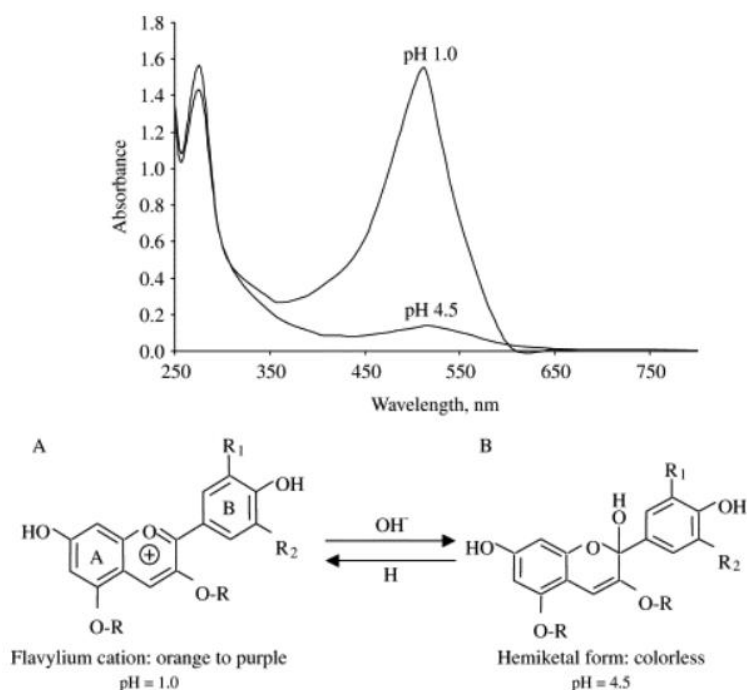
2.4.3 Stanovení celkových anthokyanových barviv pH diferenciální metodou

Anthokyaniny reverzibilně mění barvu s pH, což omezuje jejich efektivní využití jako potravinářského barviva, ale také poskytuje jednoduchý a pohodlný způsob měření celkové koncentrace těchto pigmentů. pH diferenciální metoda je ve srovnání s metodou HPLC cenově dostupnější technika pro rychlou a jednoduchou rutinní analýzu celkových monomerních anthokyanů [28, 34].

Tato metoda je modifikací původně popsaných metod Fulekiho a Francise z roku 1968 [28].

Reverzibilní změna barvy se projevuje odlišnou absorbancí. Analyzované vzorky se zředí vhodnými puframi s pH 1,0 a 4,5. Při pH 1,0 převládá barevná oxoniová forma a při pH 4,5 bezbarvá hemiketalová forma. Rozdíl absorbance při λ_{max} 510 nebo 520 nm mezi oběma tlumivými roztoky odpovídá celkovému obsahu monomerních anthokyanů. Následně se ještě vzorky proměří při vlnové délce 700 nm, z důvodu korelace chyby měření způsobené zákalem. Polymerizované anthokyaninové pigmenty a neenzymatické pigmenty nevykazují reverzibilní

chování s pH a jsou vyloučeny z výpočtu koncentrace anthokyanů. Celkové anthokyany se vypočítávají za použití molekulové hmotnosti a molárního extinčního koeficientu převládajícího anthokyaninu ve vzorku [28,34].



Obrázek 5: UV-VIS spektrum anthokyanů v pufrach o pH 1,0 a 4,5, struktury flavyliového kationtu (A) a hemiketálových forem (B). R = H nebo glykosidový substituent [28]

2.5 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Termín chromatografie poprvé použil ruský botanik Michail Cvět. V roce 1906 rozdělil směs rostlinných pigmentů. Použil k tomu skleněnou trubici, kolonu naplněnou uhličitánem vápenatým nebo oxidem hlinitým, přes kterou proléval petroether [46]. Směs pigmentů prosakovala dolů trubicí s adsorbentem, každý pigment vykazoval jinou přilnavost k adsorpční látce a tímto způsobem se pigmenty oddělily. Stejně jako v moderní kapalinové chromatografii použil tekutou mobilní fázi pro průtok složek vzorku přes kolonu s pevným materiálem stacionární fáze. Bouřlivý rozvoj HPLC nastal až když byla přístrojová laboratorní technika na vysoké technické úrovni. Byly zkonstruovány vysoce citlivé detektory, dávkovací systémy, vysokotlaká čerpadla a byla připravena celá řada vysokoúčinných univerzálních i selektivních sorbentů tvořících náplně chromatografických kolon [45, 46].

2.5.1 Princip kapalinové chromatografie

Chromatografické metody patří do skupiny separačních metod, které jsou založeny na rozdílné distribuci dělených látek ve směsi mezi dvě různé nemísitelné fáze a to mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou). V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina. Stacionární fází pak může být buď tuhá látka nebo kapalina ukotvená na tuhém nosiči. Stacionární fáze je umístěna v chromatografické koloně ve formě sorbentu. Mobilní fáze protéká tímto sorbentem, takzvaným chromatografickým ložem. Nejběžnějším uspořádáním

kapalinové chromatografie je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC, High Performance Liquid Chromatography).

Existence fázového rozhraní mezi stacionární a mobilní fází umožňuje distribuovat dělené látky mezi tyto dvě fáze. Dochází k opakovanému ustanovování rovnováhy dělených látek mezi mobilní a stacionární fází. Chromatografický systém se v ideálním případě může blížit rovnováze. Distribuci složek mezi dvě fáze pak lze popsat distribuční (rozdělovací) konstantou K_D (1):

$$K_D = \frac{c_s}{c_m} \quad 1$$

kde c_s je koncentrace složky ve stacionární fázi a c_m v mobilní fázi.

Čím vyšší je hodnota distribuční konstanty pro danou látku, tím delší dobu setrvávají molekuly ve stacionární fázi, a tím větší je jejich retence. Ta je většinou vyjádřena retenčními faktory (k). Pro dělení jednotlivých látek kapalinovou chromatografií je tedy nutné, aby se lišily svými distribučními konstantami.

Separace a eluce jednotlivých složek směsi je tedy ovlivněna jak povahou stacionární fáze, tak povahou mobilní fáze. Eluce může být buď isokratická, kdy se složení mobilní fáze v průběhu separace nemění (má stejnou eluční sílu), anebo gradientová, kdy se v průběhu separace složení mobilní fáze mění, zvyšuje se její eluční síla. Isokratická eluce je vhodná pro látky s podobnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi a tedy i hodnotami K_D . Gradientová eluce je vhodná v případě, že mají složky směsi odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti.

Separované zóny analytů vycházející z kolony jsou zaznamenávány při průchodu detektorem a signál je převeden do podoby chromatografického záznamu, který se nazývá chromatogram, což je časová závislost intenzity veličiny, která je sledována detektorem. Chromatografický záznam je charakteristický křivkami gausovského tvaru, které jsou nazývány píky (eluční křivky) [50].

2.5.2 Retenční charakteristiky

Základní charakteristickou veličinou pro každou dělenou látku je retenční čas t_R nebo retenční objem V_R . Retenční čas je charakterizovaný jako doba, která uplyne od nástřiku vzorku do dosáhnutí maxima eluční křivky a retenční objem je objem mobilní fáze, která proteče kolonou za tuto dobu. Mezi těmito veličinami existuje vztah (2):

$$V_R = F_m \cdot t_R \quad 2$$

kde F_m je objemový průtok mobilní fáze ($\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$).

Mrtvý retenční čas t_0 (objem V_0) je retenční čas (objem) složky, která není na koloně zadržována a pohybuje se stejnou rychlostí jako mobilní fáze. Retenční faktor k je mírou retence dělených látek a může být vyjádřený jako poměr retenčního objemu k mrtvému objemu (3):

$$k = \frac{V_R - V_0}{V_0} = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad 3$$

Z tohoto vztahu vyplývá, že všechny dělené látky stráví v mobilní fázi stejný čas. Liší se pouze dobou, kterou stráví ve stacionární fázi. Tato doba se nazývá redukovaný retenční čas t'_R a je vyjádřena jako retenční čas ponížený o mrtvý retenční čas (4) [50]:

$$t'_R = t_R - t_0 \quad 4$$

2.5.3 Typy kapalinové chromatografie

Chromatografie je souhrnný název pro sadu technik, které se používají pro rozdělení směsí látek. V každém typu chromatografie je separace složek směsi založena na rozdílu afinity nebo rozpustnosti složek ve dvou různých fázích, stacionární a mobilní [46].

NP-HPLC

Princip adsorpční chromatografie (také chromatografie na normální fázi NP-HPLC) je znám z klasické kolonové a tenkovrstvé chromatografie. Stacionární fází je polární materiál s vysokým měrným povrchem (silikagel, alumina – oxid hlinitý, oxid hořečnatý). Mobilní fáze je méně polární než stacionární (heptan, hexan, ethylacetát) [45, 46, 50]. Retenční mechanismus na normálních fázích je založen na soutěži mezi dělenou látkou a mobilní fází o lokalizovaná adsorpční centra na povrchu stacionární fáze (například o volné hydroxylové skupiny silikagelu). Retence je určena specifickými mezimolekulárními interakcemi látky s povrchem sorbentu a nesespecifickými interakcemi látky s mobilní fází. Adsorpce látky je důsledkem rozdílných polárních sil působících mezi povrchem sorbentu a dělenou látkou a polárních sil působících mezi povrchem sorbentu a mobilní fází [50].

Separace na normálních fázích v současnosti ustupuje do pozadí, kvůli převažujícím nevýhodám oproti separacím v jiných systémech (nevodná těkavá organická rozpouštědla). NP-HPLC nalézá uplatnění především u analytů, které se v jiných systémech rozkládají (například vlivem přítomnosti vody v mobilní fází), nebo u analytů které jsou limitovány svou rozpustností v rozpouštědlech používaných v jiných separačních systémech (například látky lipofilní povahy). Chromatografie na normálních fázích je používána pro separaci isomerů, které jsou v jiných separačních módech separovány obtížně nebo vůbec [50].

RP-HPLC

Chromatografie na obrácených fázích (RP-HPLC) je založena na užití nepolární stacionární fáze a polární mobilní fáze. Jako mobilní fáze se nejčastěji využívá směs vodných pufrů s polárními organickými rozpouštědly (methanol, acetonitril), stacionární fází (C18, C8) jsou nejčastěji dlouhé uhlíkaté řetězce navázané na povrch nosiče (silikagelu, hybridního sorbentu nebo jiných kovových oxidů) [45, 46, 50]. Na reverzních stacionárních fázích se téměř nevyskytují aktivní adsorpční centra schopná polárních interakcí. Stacionární fáze je schopna interagovat pouze slabými disperzními silami, pouze nesespecifickými mezimolekulárními interakcemi analyt – adsorbent. Nesespecifické interakce jsou mnohem slabší než polární interakce mezi polárními molekulami mobilní fáze a analytu. Tyto polární interakce zeslabují nesespecifické interakce molekul analytů a stacionární fáze a ulehčují tak jejich návrat do objemu polárního elučního činidla [50].

Separace na reverzních fázích je pro svou univerzálnost často metodou první volby. Lze ji využít jak pro směsi malých molekul, tak pro směsi velmi komplikované, jakými jsou rostlinné extrakty nebo biologické vzorky [50].

IEC

Iontově výměnná chromatografie (IEC) je založena na silných elektrostatických interakcích mezi ionizovanými funkčními skupinami měniče (stacionární fáze) a opačně nabitými ionty v okolním roztoku. Síla interakce je určena počtem a velikostí náboje analytu a funkční skupiny. Dělené ionty jsou z kolony eluovány zvyšující se koncentrací iontů v mobilní fázi v pořadí, v jakém stoupá afinita iontu ke stacionární fázi [45, 46, 50].

IEC patří mezi nejstarší chromatografické techniky v kapalně fázi. Je využívána pro separaci aminokyselin, separaci kationtů a aniontů ve vodách, separaci karboxylových kyselin ve víně, nukleových kyselin a peptidů [50].

IP-HPLC

Iontově párová chromatografie (IP-HPLC) bývá používána pro podobné aplikace jako iontoměničová chromatografie. Během jedné separace je možné současně dělit látky kyselé, zásadité i neutrální [45, 46]. Je využívána tvorba iontových asociátů mezi dělenými látkami iontové povahy a opačně nabitým iontem, jehož molekula obsahuje relativně velký nepolární podíl (tenzidy). Separace iontového asociátu pak probíhá na stacionárních fázích pro reverzní chromatografii [50].

Metoda IP-HPLC se před plným rozvinutím metody HILIC uplatňovala pro separaci velmi polárních kyselých a bazických látek, zejména aminů. Uplatnila se ve farmaceutických i bioanalytických aplikacích, ale i v analýze anorganických analytů [50].

HILIC

Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC) je chromatografie na bázi smíšených retenčních mechanismů, je kombinací rozdělovací chromatografie, adsorpce, iontových interakcí a hydrofobní retence a je silně závislá na charakteru a složení mobilní fáze. HILIC umožňuje detekci polárních/iontových analytů, které jsou typicky špatně nebo vůbec zadržovány na obrácených fázích. Využívá polární stacionární fázi (oxid křemičitý, nebo polárně vázané skupiny) a vodně-organickou mobilní fázi, typická je počáteční eluční kompozice 98 % organické složky a 2 % vody) [46, 47]. Mechanismus retence v HILIC není plně objasněn. Mezi navrhovanými principy figuruje mechanismus rozdělování mezi hydrofobní částí mobilní fáze a silně hydrofilní vrstvou vody, která je imobilizována na povrchu polární stacionární fáze. Na polárních centrech stacionární fáze dochází k přednostní adsorpci vody a vzniká difuzní vrstva s gradientem koncentrace vody směrem do mobilní fáze. Stacionární fáze se tak chová jako přenašeč vody.

Metoda HILIC je v poslední době velice oblíbenou technikou ve farmaceutických a v bioanalytických aplikacích [50].

SEC

Molekulová vylučovací chromatografie (SEC) neboli gelová chromatografie, je založena na rozdělování molekul podle jejich velikosti v koloně naplněné pórovitým polymerním gelem. Na rozdíl od dalších separačních módů by zde nemělo docházet k žádným dalším interakcím.

Metoda se využívá pro skupinovou separaci, to je dělení dvou a více látek s velkým rozdílem molekulových hmotností, například k odsolení proteinů, polysacharidů. SEC se také využívá jako purifikační metoda k frakcionaci skupin molekul, ke stanovení molekulové hmotnosti nebo distribuce velikosti molekul polymerů.

Afinitní chromatografie

Afinitní chromatografie je separační technika založená na specifické a současně vratné interakci mezi dvěma molekulami různých látek, například mezi biospecifickým ligandem kovalentně navázaným na polymerní nerozpustnou inertní matici a mezi analytem (biomolekulou) s afinitou k tomuto ligandu. Po odstranění neadsorbovaných látek lze pak specificky vázanou látku vymýt ligandem v její nezměněné formě.

Tato metoda je používána především k izolaci, purifikaci a analýze fyziologicky významných látek (proteiny, glykoproteiny, enzymy, hormony, toxiny). Afinitní metody jsou často používány pro čištění a pre-koncentraci stopových množství sloučenin v komplexních maticích [50].

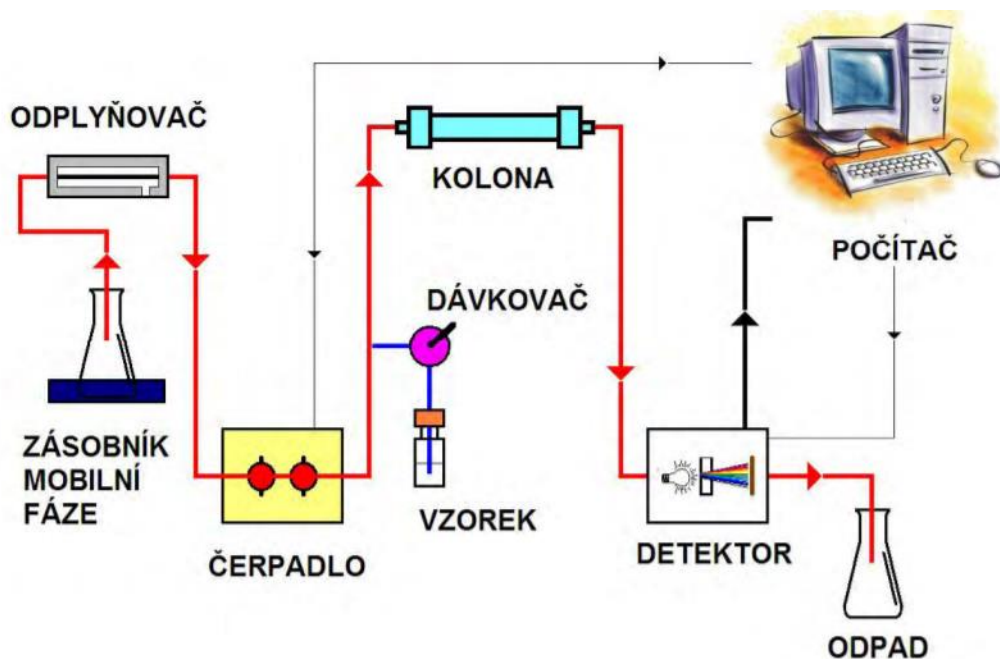
Chirální chromatografie

Chirální separace je důležitá v oborech jako je farmacie, biochemie, životní prostředí, výroba a analýza pesticidů. Mnoho látek může být ve formě příslušných enantiomerů a ty mohou mít odlišné vlastnosti v chirálním prostředí. Proto je jedním z často využívaných typů HPLC separace na chirálních fázích [45].

2.5.4 HPLC instrumentace

Chromatograf se skládá z několika základních elementů. V zásadě musí být zachováno základní řazení těchto komponentů za sebou [48]:

- uchování a transport mobilní fáze (zásobníky mobilní fáze, vysokotlaké čerpadlo)
- dávkování vzorku (autosampler, manuální dávkovací ventil)
- separace látek (chromatografická kolona, termostat kolony)
- detekce látek (detektor)
- záznam dat pro následující vyhodnocení (počítač a software) [50]



Obrázek 6: zjednodušené schéma HPLC [49]

2.5.4.1 Uchování a transport mobilní fáze

Pro uchování, přípravu a transport mobilní fáze slouží zásobník s mobilní fází, zařízení pro odplynění mobilní fáze, vysokotlaké čerpadlo, tlumič pulsů a mixery mobilní fáze. V zásobníku mobilní fáze jsou speciální filtry pro odstranění suspendovaných tuhých částic (kovový nebo teflonový filtr). Zásobníky musí být dobře uzavřeny, aby z nich kapalina mohla odtékat, ale přitom neunikaly páry do okolní atmosféry. Spojení zásobníku s ostatními částmi zařízení jsou zhotoveny z teflonu nebo z nerez oceli.

Mobilní fázi je nutné odplynit proto, aby po uvolnění tlaku na výstupu chromatografické kolony nebo i v koloně nedocházelo k uvolňování bublinek rozpuštěných plynů. Pro odplynění mobilní fáze se využívají v podstatě čtyři metody, které mohou být použity samostatně nebo v kombinaci a to ultrazvuk, probublávání heliem (on-line), vakuum – in-line vakuové odplynění a vakuová filtrace, ohřev.

U čerpadel pulsního typu je základní charakteristikou takzvaný průtokový profil čerpadla, který vyjadřuje závislost polohy pístu na čase. Tyto pulsy se mohou částečně odstranit zařazením další hlavy pracující v opačné fázi a může se tak dosáhnout pulsujícího průtoku bez nežádoucích prodlev.

Na vysokotlaká čerpadla jsou kladeny poměrně náročné požadavky. Výstupní tlaky na čerpadlech se musí pohybovat v rozmezí 1 až 60 MPa, změna průtoku mobilní fáze musí být v širokém rozmezí (0,1 až 10,0 ml), průtok mobilní fáze musí být reprodukovatelný a přesný, průtok mobilní fáze musí být bezpulzní a bez monotónních změn, materiál použitý ke konstrukci čerpadel musí být odolný vůči korozi, vnitřní objem čerpadel musí být co nejmenší, aby umožnil rychlou výměnu mobilní fáze.

Pneumatická čerpadla patří mezi čerpadla pracující za konstantního tlaku, přičemž tlak potřebný k pohybu kapaliny je způsoben tlakem plynu na stlačitelný zásobník mobilní fáze, nad

hladinu stlačované kapaliny nebo přímo na píst či membránu. Regulace průtoku mobilní fáze je možná změnou tlaku plynu. Při změně odporu kolony se však objemový průtok mění.

Čerpadla injekčního typu – tlak na píst v těchto čerpadlech se vyvíjí speciálním krokovým elektromotorem, se kterým je spojen táhlem se závitem a převodovkou, která zajišťuje rychlý zpětný chod pístu při plnění pracovního válce mobilní fáze. Tato čerpadla zajišťují konstantní průtok mobilní fáze kolonou a bezpulznost. Nedostatkem je limitovaný objem mobilní fáze daný objemem pracovního válce, čas potřebný k dosažení stabilního průtoku mobilní fáze a vysoká cena.

Pístová čerpadla jsou konstruována tak, aby mrtvý objem čerpadla (objem kapalné fáze v pracovní části výtlačného válce při maximu výtlaku) byl co nejmenší. Požadovaný průtok mobilní fáze lze nastavit ovládním otáček elektromotoru. Výhodou těchto čerpadel je neomezené dávkování mobilní fáze na kolonu bez přerušování toku.

Membránová čerpadla jsou podobná pístovým čerpadlům s tím rozdílem, že v hlavě čerpadla je umístěna membrána, která zprostředkuje styk hydraulické kapaliny (nejčastěji olej) s mobilní fází na druhé straně membrány. Hydraulická kapalina je stlačována pístem čerpadla a tento tlak je přenášen přes membránu na mobilní fázi, která je prostřednictvím sacího a výtlačného ventilu vytlačována do chromatografické kolony.

2.5.4.2 Tvorba gradientu mobilní fáze

Nízkotlaký gradient – složky mobilní fáze se míchají za atmosférického tlaku před vstupem do vysokotlakého čerpadla v malé směšovací komůrce, poměr směšovaných složek se řídí otevíráním a zavíráním ventilů na vstupu do komůrky, pomocí nízkotlakých mikročerpadel nebo pomocí proporcionálního ventilu. Tento způsob gradientu se vyznačuje vysokou přesností, ale vyžaduje sladění pracovní periody ventilů a čerpadla a dokonalé odvodušnění mobilní fáze.

Vysokotlaký gradient – každá složka mobilní fáze má svoje vysokotlaké čerpadlo a je dávkována do směšovací komůrky před kolonou. Nevýhodou je menší přesnost tvorby gradientu vlivem stlačitelnosti kapalin a objemových změn při směšování.

2.5.4.3 Dávkování vzorku

Dávkování vzorku injekčními stříkačkami přes vhodné septum nebo při zastaveném průtoku mobilní fáze, se v současné době nepoužívá zejména pro vysoké tlakové nároky na použité septum a hlava kolony musí být konstruována tak, aby jehla stříkačky dosáhla právě na konec vrstvy náplně kolony. V současné době se používají manuální smyčkové dávkovače na principu přepínacích ventilů nebo automatické dávkovače.

Dávkovací vysokotlaké ventily umožňují dávkovat i při tlaku 60 až 80 MPa pouze konstantní objem vnitřního prostoru ventilu nebo při zařazení dávkovací smyčky objem smyčky. Dávkovací ventily mohou být elektricky nebo pneumaticky ovládané.

Automatické dávkovače (autosamplery) jsou spojené se zásobníkem vzorků, ve kterém jsou umístěny vialky uzavřené pryžovým septem nebo perforovanou zátkou z polypropylenu. Je několik druhů spojení injekční stříkačky dávkovače a zásobníku. V prvním případě je injekční

stříkačka dávkovače fixní a pohybuje se pouze zásobník vzorků pod zvednutou jehlou dávkovače, jejíž píst je ovládán speciálním krokovým motorem. V druhém případě je zásobník vzorků fixní a pohybuje se raménko injekční stříkačky. Nebo je fixní zásobník i injekční stříkačka dávkovače, vialky jsou roboticky dopravovány pod zvednutou jehlu dávkovače.

2.5.4.4 Kolony

Kolony se vyrábějí převážně z oceli, která je vysoce antikorozivní, nicméně v případě použití chloridových solí je však přesto málo odolná. Materiál, ze kterého se zhotovuje vnitřní povrch musí odolávat vysokým tlakům, a to až do 70 MPa, musí odolávat chemickému působení mobilní fáze a pokud možno by měl být vnitřní povrch dokonale hladký. Do tlaku 20 MPa je možné používat kolony ze speciálně tvrzeného skla, které se vkládají do kovového pouzdra a odolávají tak vyšším tlakům a jsou chemicky stabilnější. Pro analytické účely se používají analytické kolony o vnitřním průměru 2,1 až 5 mm, délce 10 až 300 mm a plněné náplněmi o velikosti částec 1 až 10 μm .

Klasická HPLC kolona je složena z kovového pláště, který je uzavřen porézní kovovou fritou. Ta zabraňuje uvolňování stacionární fáze z kolony a současně umožňuje plynulý průtok mobilní fáze. Oba konce kolony jsou ukončeny ochranným kroužkem a koncovou hlavicí, ve které je navrtán vstup pro kapiláru se šroubením [50, 51].



Obrázek 7: HPLC kolony [30]

Kolony se dnes plní komerčně. Podle způsobu plnění kolon můžeme plnění rozdělit na plnění za sucha a plnění za mokra.

2.5.4.5 Detektory

Detektory jsou umístěny na konci kolony a analyzují eluent. Zaznamenávají rozdíl mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze obsahující eluovanou složku celou detektoru.

Spektrometrické detektory

Spektrometrické detektory jsou založeny na principu absorpce záření v oblasti vlnových délek od 190 do 800 nm. Kvantitativní vyhodnocení je založeno na Lambert-Beerově zákoně. Základem činnosti spektrofotometrických detektorů nebo obecně detektorů s průtočnou celou je samotná celá detektoru. Konstrukce celý detektoru musí být taková, aby se eliminovalo mísení separovaných elučních zón.

Podle konstrukčního uspořádání dělíme tyto detektory na:

- Detektory s fixní vlnovou délkou (nejčastěji 253,7 nm), jako zdroj záření je zde nízkotlaká rtuťová výbojka.
- Detektory s měnitelnou vlnovou délkou s předem danými vlnovými délkami.
- Detektory s programovatelnou vlnovou délkou, vlnová délka je měnitelná během analýzy v určitém rozmezí, většinou od 190 do 700 nm.
- Detektory s diodovým polem (PDA) snímají celé spektrum v reálném čase bez přerušení chromatografické separace. Záření ze zdroje po průchodu měrnou celou detektoru je spektrálně rozkládáno holografickou mřížkou, takže na každou z fotodiod dopadá zářivý tok o určité vlnové délce zeslabený absorpcí v cele detektoru. Každá fotodioda je spojena s kondenzátorem, který je předem nabitý na určitou hodnotu. Fotoelektrický proud, který vzniká po dopadu záření na diodu, pak vybije kondenzátor, což je úměrné intenzitě dopadajícího záření. V další fázi jsou kondenzátory nabity a je měřen proud, který je potřebný na dobítí příslušných kondenzátorů. Velikost tohoto proudu je ukládána do paměti řídicí jednotky.

Fluorescenční detektory

Tyto detektory jsou založeny na principu fluorescence a měření sekundárního, emisního záření. Absorpcí elektromagnetického záření přecházejí molekuly látek ze základního singletového elektronového stavu do různých vibračních hladin excitovaného singletového elektronového stavu. Absorbovanou energii může excitovaná molekula opět vyzářit jako fluorescenci nebo ji přeměnit zcela jiným mechanismem na energii vibrační nebo ji předat jiným molekulám. Ztrátou vibrační energie přejde molekula nejprve do základního vibračního stavu a pak emituje fluorescenční záření, které má stejnou vlnovou délku jako absorbované záření nebo častěji je vlnová délka emitovaného záření vyšší v důsledku vibrační relaxace.

Elektrochemické detektory

Tyto detektory jsou používány pro detekci látek, které jsou schopné elektrochemické reakce probíhající na fázovém rozhraní elektroda – roztok (mobilní fáze). Elektrochemické detektory měří určitou elektrickou veličinu vyvolanou průchodem látky průtokovou celou detektoru, ve které jsou umístěny elektrody s vloženým pracovním napětím nezbytným k průběhu elektrochemické reakce, a to v systému dvouelektrodového nebo tříelektrodového zapojení. U těchto detektorů je tedy sledována závislost mezi elektrickou veličinou a koncentrací sledované složky.

Refraktometrické detektory

Refraktometrické detektory jsou nejstaršími používanými univerzálními detektory. Mají řadu nevýhod jako je nízká citlivost detekce, teplotní závislost odezvy, nutnost zachování konstantního průtoku mobilní fáze bez pulzů a nemožnost použít gradientové eluce.

Odezva refraktometrického detektoru je úměrná rozdílu indexu lomu eluátu v měrné cele a indexu lomu mobilní fáze v referenční cele detektoru. Detektor bude tím citlivější, čím větší bude rozdíl mezi indexem lomu eluátu a indexem lomu mobilní fáze. Stablní odezva detektoru

je podmíněna konstantní teplotou v průběhu měření, proto je průtoková cela termostatována na teplotu s tolerancí $\pm 0,01$ °C.

Vodivostní detektory

Vodivostní detektory měří elektrickou vodivost eluátu v průtokové cele mezi dvěma elektrodami, na něž je vkládáno střídavé napětí, aby bylo zabráněno polarizaci těchto elektrod. Tyto detektory mají největší uplatnění v iontové chromatografii, kde jsou využívány kolony plněné ionexy s nízkou kapacitou.

Hmotnostně spektrometrická detekce

Hmotnostní spektrometry jsou detektory v HPLC patřící do skupiny spojených technik. Jsou velmi specifické, a kromě údajů z chromatogramu poskytují spektrální údaje o identitě látky. Jsou využívány pro bioanalytické a environmentální aplikace, potravinovou analýzu, proteomiku, pro výzkum a vývoj nových lékových forem a pro další aplikace.

Proces identifikace či kvantifikace se odehrává ve třech krocích. Nejprve je nutné vzorek ionizovat, kdy jsou neutrální molekuly v iontovém zdroji převedeny na ionty. Poté následuje rozdělení iontů podle poměru hmotnost/náboj, jejich urychlení v analyzátoru, a nakonec detekce iontů a zesílení signálu v detektoru [50, 51].

2.6 Použité metody

2.6.1 Metody k zakoncentrování extraktů

Proces koncentrace je široce používaná operace pro prodloužení trvanlivosti ovocných výrobků způsobené snížením vodní aktivity. Běžně se používají metody atmosférického a vakuového odpařování. Proces odpařování v atmosféře však může způsobovat některé nežádoucí změny, jako je změna barev, ztráta živin a tvorba nežádoucích složek, jako je například hydroxymethylfurfural. V procesu vakuového odpařování by změny barev a vznik nežádoucích složek měl být minimalizován, jelikož proces pracuje při nižších teplotách. Má však určité nevýhody, jako je možná degradace aromatických složek nebo těkavých mastných kyselin díky dlouhé době zpracování a nízké energetické účinnosti procesu. Pro zvýšení efektivního využití energie se využívají systémy s víceúčelovými vakuovými výparníky. Koncentrace reverzní osmózou, membránové procesy nebo vymrazování jsou alternativními procesy odpařování, které mají vysoké instalační a provozní náklady, jejich dlouhá doba zpracování materiálu je omezující pro použití těchto technik v průmyslu [35].

2.6.1.1 Rotační vakuová odparka

Rotační vakuová odparka slouží k odstranění rozpouštědla ze vzorku. Jedná se o jednoduché zařízení, které zajistí zvýšení dostupného povrchu kapaliny, ze kterého se může rozpouštědlo odpařovat, zvyšuje tok tepla k odpařovací ploše. Zařízení pracuje za sníženého tlaku pro usnadnění odpařování rozpouštědla při relativně nízkých teplotách [36]. Celoskleněná rotační vakuová odparka je komerčně dostupný přístroj, který se snadno nastavuje a čistí. Odpařovaný vzorek je umístěn do baňky s kulatým dnem, která je napojena na střední skleněné spojovací vřeteno, které prochází zařízením, které otáčí baňkou. Na druhém konci středního spojovacího

vřetene může být napojen kondenzátor (chladič) s hadicovou přípojkou k vodě, který urychluje kondenzování rozpouštědla, jeho součástí může být baňka pro sběr vniklého kondenzátu [39]. Otáčení baňky je nutné kvůli vytvoření filmu kapaliny na povrchu odpařovací baňky. V případě potřeby aplikace tepla se baňka otáčí ve vodní lázni nebo na ni působí tepelná lampa. Jako zdroj vakua se využívá laboratorní vodní vývěva nebo vakuový motor (pumpa) [36].

2.6.1.2 Lyofilizace

Lyofilizace neboli sušení vymrazováním je proces, při kterém se voda zmrazí a následně se odstraní ze vzorku. Nejprve sublimací (primární sušení) a následně desorpcí (sekundární sušení). Tento proces se využívá při výrobě některých léčiv a biologických látek, které jsou termolabilní nebo jinak nestabilní ve vodném prostředí při delší době skladování. V potravinářském průmyslu se lyofilizace používá k uchování potravin [37]. Lyofilizují se například ovoce, zmrzlina, kukuřičné vločky (corn flakes), cereální tyčinky, omáčky, žloutky, maso (kuřecí prsa), extrakty z ovoce [38].

Hlavním principem při lyofilizaci je sublimace, při které voda přechází z pevného stavu (led) přímo do plynného stavu bez přechodu kapalnou fází. Sublimace může probíhat pro tlak a teplotu pod trojným bodem. Materiál se nejprve zmrazí, následně je zmrazený materiál umístěn do vakua což umožňuje zmrazenému rozpouštědлу sublimovat. Na zmrazený produkt se aplikuje teplo, které urychlí sublimaci. Odpařené rozpouštědlo se díky nízkoteplotním kondenzačním deskám odstraní z vakua [37].



Obrázek 8: lyofilizátor [31]

2.6.2 UV-VIS spektrofotometrie

Molekulová absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti se zabývá měřením a interpretací elektronových spekter molekul látek, které absorbují elektromagnetické záření v rozsahu vlnových délek 200 až 800 nm. Látky, které absorbují záření s vlnovou délkou menší

než 380 nm (ultrafialové záření) jsou bezbarvé. Látky, které absorbují z bílého viditelného slunečního záření vlnové délky 380 až 770 nm jsou barevné [52]. Oblast záření s vlnovou délkou menší než 200 nm se označuje jako vakuová ultrafialová oblast, která pro sledování absorpce vyžaduje speciální evakuované aparatury, jelikož záření je absorbováno vzduchem [52,53].

Kvantitativní vyhodnocení je založeno na Lambert-Beerově zákoně, který vyjadřuje vzájemný vztah mezi tloušťkovou absorbující vrstvy l , koncentrací absorbující složky c a vlastní velikosti absorpce, vyjádřenou jako absorbance A (5):

$$A = l \cdot c \cdot \varepsilon \quad 5$$

kde ε je absorpční konstanta (molární absorpční koeficient), který je pro každou látku charakteristický. Absorbance je zároveň vlastností měřeného vzorku. K její změně dochází se změnou koncentrace látek ve vzorku a se změnou délky absorpční vrstvy [50].

Na měření absorpce UV nebo VIS záření se používají různé typy přístrojů. Od nejstarších kolorimetrů a fotometrů až po moderní spektrofotometry se sériovým měřením spekter.

Základními částmi každého spektrometru jsou zdroj záření, monochromátor, kyveta se vzorkem, referenční kyveta, detektor, zesilovač a registrační zařízení. Jako zdroj spojitého záření se používají pro UV oblast vodíková nebo častěji deuteriová výbojka a pro VIS oblast se používají wolframové nebo halogenové žárovky. Pro získání monochromatického záření se používají mřížky ve spojení se vstupní a výstupní štěrbinou. Kyveta se vkládá mezi monochromátor a detektor záření. Kyvety mají konstantní vnitřní hloubku absorbující vrstvy od 0,1 až do 10 cm, nejčastěji se používá 1 cm kyveta. Hodnocení velikosti absorpce se uskutečňuje za použití fotoelektrických detektorů citlivých na UV i VIS záření [52].

Základní prvky spektrofotometrů mohou být uspořádány způsobem jednopaprskovým nebo dvoupaprskovým. U jednopaprskového spektrofotometru prochází záření ze zdroje po nastavení vlnové délky v monochromátoru nejprve kyvetou obsahující srovnávací vzorek, kde je záření poněkud zeslabeno (odrazem stěn kyvety, absorpcí rozpouštědlem nebo ostatními složkami roztoku) a dopadá na detektor. Vzniklý fotoelektrický proud je změřen a je mu přiřazena nulová hodnota absorbance. Po nahrazení kyvety se srovnávacím roztokem kyvetou se vzorkem je pak změřena jeho absorbance. U dvoupaprskových spektrofotometrů je paprsek po výstupu z monochromátoru rozdělen na paprsek procházející měrnou a srovnávací kyvetou [53].

2.6.3 Stanovení fenolických látek podle Folin-Ciocalteua

Stanovení celkového obsahu fenolických látek je většinou založeno na oxidačně redukčních vlastnostech. Fenolické látky fungují jako redukční činidla. Nejpoužívanější metodou pro stanovení celkových fenolických látek v rostlinných extraktech a šťávách je stanovení podle Folin-Ciocalteua. Pro stanovení fenolických látek existují i další metody, jako je metoda podle Price a Butlera a metoda s použitím aminiantipyrinu [40].

Pro stanovení fenolických látek metodou podle Folin-Ciocalteua se využívá speciálního činidla pojmenovaného po výše uvedených chemících. Folin-Ciocalteuovo činidlo je připraveno

z wolframanu sodného, molybdenanu sodného, koncentrované kyseliny chlorovodíkové, kyseliny fosforečné, síranu lithného a vody [41]. Reakce je založena na oxidaci fosfowolframát-fosfomolybdenátového komplexu fenolickými sloučeninami. Množství vzniklých modrých produktů je přímo úměrné množství přítomných fenolických látek [42]. Folin-Ciocalteuovo činidlo reaguje s širokým spektrem sloučenin, proto je absorpční pík široký a pro analýzu lze použít široký rozsah vlnových délek. Nejčastěji používané vlnové délky jsou 750, 760 a 765 nm. Kalibrační křivka se často tvoří pomocí kyseliny gallové, výsledná koncentrace fenolických látek se pak vyjadřuje jako ekvivalent kyseliny gallové (GAE) [43, 44].

2.6.4 Stanovení sušiny

Nejpoužívanější metoda pro stanovení sušiny je sušení při 105 °C do konstantního úbytku hmotnosti. Využívá se zde proces difuze, což je transport vody z vnitřních vrstev na povrch, kde se voda povrchově odpařuje. Rychlost sušení závisí na povaze vzorku, tvaru částic, množství vzorku, teplotě, vlhkosti, rychlosti a směru proudění sušícího média. Pro sušení se využívají sušárny s nucenou cirkulací vzduchu nebo s infrazářiči. Dále je možné využívat infralampy [54].

Refraktometrické stanovení sušiny je založené na úměrnosti mezi indexem lomu a koncentrací ve vodě rozpustných látek ve vzorku. Měří se mezní úhel, který se zjistí v okuláru refraktometru jako rozhraní tmavého a světlého pole. Při praktickém měření se odečítá na škále refraktometru buď index lomu, nebo stupně refraktometrické sušiny. Refraktometry jsou kalibrovány na hmotnostní % sacharózy. Proto údaje získané refraktometricky udávají množství rozpustných látek ve vzorku, který odpovídá množství čisté sacharózy se stejným indexem lomu. K měření indexu lomu se využívá Abbeho refraktometr nebo ponorný Pulfrichovův refraktometr [53, 54].



Obrázek 9: Abbeho refraktometr [56]

Refraktometrie se používá hlavně pro měření indexu lomu kapalin a pevných látek. Index lomu se užívá k identifikaci látek, k posouzení jejich čistoty a někdy k ověření struktury organických látek [53].

2.6.5 Stanovení aktivní kyselosti a celkové titrační kyselosti

Organické kyseliny jsou důležitou sensorickou a dietetickou složkou potravin. Jsou významné i z technologického hlediska jako bakteriostatické látky, které snižují pH a ovlivňují trvanlivost potravin. V rostlinných materiálech převládá kyselina citronová, jablečná a vinná [55].

Stanovení aktivní kyselosti

Aktivní kyselost je vyjádřena hodnotou pH [55]. Význam této hodnoty je velmi důležitý pro posouzení sensorické kyselosti, údržnosti potravin a při různých technologických postupech. Nejpřesnějším měřením je potenciometrické měření pH. Touto metodou se měří elektromotorické napětí článku srovnávací (referenční) a indikační elektrody. Jako referenční elektroda se používá kalomelová elektroda ($\text{Hg} \mid \text{Hg}_2\text{Cl}_2 (\text{s}) \mid \text{KCl} (\text{s})$). Jako indikační elektrody se používají elektrody, které jsou závislé na aktivitě vodíkových iontů, v analýze potravin nejčastěji elektroda skleněná a antimonová. Měření pH kapalných vzorků se vykonává přímo. Z tuhých vzorků se připraví vodný výluh a ten se proměří [54].

Stanovení celkové titrační kyselosti

Celkovými kyselinami se myslí celkové množství volných kyselin těkavých i netěkavých a kyselých solí, které je možno zneutralizovat hydroxidem sodným nebo draselným. V potravinách se nejčastěji stanovuje obsah kyselin alkalimetrickou metodou titrací odměrným roztokem hydroxidu na vhodný barevný indikátor nebo potenciometrickou indikací bodu ekvivalence, tato metoda je využívána především u barevných vzorků. Metoda s použitím indikátoru se používá pro bezbarvé vzorky, jako indikátor se nejčastěji používá fenolftalein. Spotřeba hydroxidu se přepočítá na určitou převažující kyselinu [55].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Původ rostlinného materiálu

Pro tuto diplomovou práci byly použity výlisky z plodů černého bezu odrůdy Haschberg. Plody pocházely z biosadu Agrofrukt Hustopeče a byly sklizeny v létě roku 2017. Plody byly vylisovány ve firmě Réva Rakvice, odkud byly výlisky převezeny na Fakultu chemickou VUT v Brně, kde byly zamrazeny v igelitových sáčcích.

3.2 Laboratorní vybavení

3.2.1 Přístroje

- Lednička s mrazničkou (Liebherr, Německo)
- Analytické váhy Pioneer (Ohaus, USA)
- Předvážky A&D Instruments EK-600 H (A&D Instruments, Japonsko)
- Třepačka IKA® KS130 basic (IKA-Werke, Německo)
- Třepačka Vibramax 100 heidolph (Heidolph, Německo)
- Rotační vakuová odparka IKA® WERKE RV 06-ML ((IKA-Werke, Německo))
- Rotační vakuová odparka Hei-VAP Advantage Heidolph (Heidolph, Německo)
- Membránová vývěva Fisherbrand FB 65454 (Fisher Scientific, USA)
- Lyofilizátor Freeze dry system/freezezone 4.5 LABCONCO (LABCONCO, USA)
- Rotační olejová vývěva RZ 6 Vacuubrand (Vacuubrand, Německo)
- pH metr HANNA INSTRUMENTS HI 221 (Hanna Instruments Czech s.r.o., ČR)
- magnetická míchačka Color Squid (IKA Werke, Německo)
- UV-VIS spektrofotometr Helios γ (ThermoSpectronic, Velká Británie)
- Přístroj na přípravu vody pro HPLC (Labicon, ČR)
- Ultrazvuková vana (Kraintek s.r.o., SR)
- Laboratorní digestoř Merci (Merci s.r.o., ČR)
- Sušárna Memmert UFE550 (Mettler, Německo)
- Abbeho refraktometr A. Krüss GmbH (A.KRÜSS Optronik GmbH, Německo)

HPLC systém (Schimadzu, Japonsko)

- Kapalinový chromatograf LC-10
- Gradientová pumpa LC-10AD
- DAD detektor SPD-M10AVP
- Dávkovací ventil Rheodyne, Model 7725i (ThermoFischer, USA)
- PC se softwarem pro řízení a sběr dat CLASS-LC10

3.2.2 Pomůcky

- Běžné laboratorní sklo, Büchnerova nálevky, exsikátor, mikrozkušavky, plastové nádoby
- Filtrační papír, parafilm, alobal, celulosové stříkačkové mikrofiltry (póry: 0,45 μm , průměr: 25 mm)
- Laboratorní stojan, stojan na zkušavky, teploměr
- Automatická pipeta Sartorius Proline 100–1000 μl (Biohit, Finsko)

- Automatická pipeta Biohit Proline 20–200 µl (Biohit, Finsko)
- Skleněná kyveta
- Injekční stříkačka 2 ml (Chirana Injecta, SR)
- Kolona Kinetex® 5µm EVO C18 100 A, 250 × 4,6 mm (Phenomenex, USA)

3.2.3 Chemikálie

- Destilovaná voda a redestilovaná voda (FCH VUT, ČR)
- Ethanol 96 % (Sigma Aldrich, Švýcarsko)
- Chlorid draselný p.a. (Lachema, ČR)
- Koncentrovaná kyseliny chlorovodíková (ONEX, ČR)
- Sodná sůl kyseliny octové p.a. (Lachema, ČR)
- Bezvodý uhličitan sodný (Lachema a.s., ČR)
- Folin-Ciocalteuovo činidlo (Sigma Aldrich, Švýcarsko)
- Kyselina gallová (Penta, ČR)
- Hydroxid sodný (Sigma Aldrich, Švýcarsko)
- Dihydrát kyseliny šťavelové (Lachema, ČR)
- Fenolftalein (Lachema, ČR)
- Acetonitril Chromasolv, HPLC grade (Sigma Aldrich, Německo)
- Kyselina mravenčí, 98% p.a. (Lach-ner s.r.o., ČR)
- Cyanin chloride (Sigma Aldrich, Německo)
- Kuromanin chloride (Sigma Aldrich, Německo)

3.3 Příprava extraktů z výlisků bezu černého vybranými postupy

3.3.1 Úprava výlisků před extrakcí

Výlisky bezu černého byly vyjmuty z mrazáku a rovnoměrně rozprostřeny na Petriho misky. Na Petriho miskách byly výlisky sušeny v sušárně na 40 °C do konstantní hmotnosti. Po usušení byly uchovávány v exsikátoru na temném místě.



Obrázek 10: výlisky bezu černého vysušené při 40 °C

3.3.2 Extrakce suchých bezových výlisků

Na analytických váhách bylo naváženo přesně 25,0 g sušených výlisků. Výlisky byly převedeny do Erlenmeyerovy baňky a zality příslušným množstvím rozpouštědla. Jako rozpouštědlo byla použita voda o laboratorní teplotě, voda o teplotě 95 °C a směs vody a 96% ethanolu v poměru 1:1. Byly testovány poměry výlisků ku rozpouštědlu 1:2; 1:2,4; 1:3,2; 1:4; 1:5 a 1:6. Hrdla baněk byla přetažena parafilmem a baňky byly umístěny na třepačku. Po ukončení extrakce byl extrakt přefiltrován přes Büchnerovu nálevku.

Po stanovení nejlepšího poměru výlisků a rozpouštědla byla extrakce pro daný poměr opakována. Extrakt z této opakované extrakce byl použit pro lyofilizaci a pro výrobu koncentráту.

3.4 Stanovení zbytkové vlhkosti výlisků usušených při 40 °C

3.4.1 Příprava vzorků a vlastní měření

Výlisky bezu černého, které byly vysušeny při 40 °C do konstantní hmotnosti, byly rovnoměrně rozprostřeny na Petriho misky, které byly vysušeny v sušárně a po vychladnutí v exsikátoru byly zváženy na analytických váhách. Petriho misky s výlisky bezu byly vloženy do sušárny a sušeny při 105 °C do konstantní hmotnosti sušeného materiálu. Před každým vážením byly Petriho misky přemístěny do exsikátoru a po vychladnutí zváženy na analytických váhách. Stanovení bylo provedeno třikrát.

3.4.2 Výpočet

Zbytkový obsah vlhkosti ve vzorku byl určen z rozdílu hmotnosti vzorku před vysušením a hmotnosti vzorku po vysušení. Výsledek byl vyjádřen v hmotnostních procentech. Zbytkový obsah vlhkosti byl vypočítán dle následující rovnice (6):

$$w_v = (m_n - m_s) \cdot 100 \% \quad 6$$

kde w_v je obsah zbytkové vlhkosti (hm. %),

m_n je hmotnost původní navážky výlisků (g),

m_s hmotnost sušiny (g).

3.5 Příprava koncentrátů z extraktu bezových výlisků

Extrakt z výlisků černého bezu byl nalit do baňky s kulatým dnem a se zábrusem. Baňka byla nasazena na zábrusové hrdlo vakuové odparky. Bylo zapnuto zahřívání vodní lázně a teplota vody byla po celou dobu odpařování kontrolována teploměrem. Byla přivedena voda do chladiče vakuové odparky. Byla spuštěna vodní vývěva v případě odpařování extraktu ethanol/voda. Při přípravě koncentráту z extraktu, kde byla rozpouštědlem pouze voda, byla použita membránová vývěva. Pomocí ventilu bylo zařízení odvzdušněno a baňka byla umístěna do vodní lázně tak, aby byla ponořena. Bylo spuštěno otáčení hlavy s baňkou.

Po skončení odpařování bylo zařízení zavzdušněno, byla vypnuta vývěva a přívod vody do chladiče. Objem koncentráту byl změřen ve válci. Koncentráty byly pro další analýzu uchovány

v mrazničce. Maximální vakuum u použité skleněné vodní vývěvy je výrobcem udáváno jako 100 mmHg (13,3 KPa). Pracovní vakuum membránové vývěvy bylo 1 hPa.

3.6 Lyofilizace extraktu z bezových výlisků

Bezový vodný extrakt byl nalit do baňky pro lyofilizaci. Baňka byla v horizontální poloze umístěna do mrazničky, tak aby měl zmrzlý extrakt co největší plochu. Baňka se zamrazeným extraktem byla upevněna do lyofilizátoru. Lyofilizátor byl nastaven na teplotu $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ a vakuum $86 \cdot 10^{-3}$ mbar (8,6 Pa). Po ukončení lyofilizace byl produkt z baňky převeden do připravené uzavíratelné nádoby a zvážen.



Obrázek 11: lyofilizát z extraktu bezu černého

Pro stanovení vybraných chemických charakteristik lyofilizátu byl připraven 20% vodný roztok lyofilizátu. Bylo přesně na analytických vahách naváženo 2,500 g lyofilizátu, navážky byla převedena destilovanou vodou do odměrné baňky na 50 ml. Odměrná baňka byla doplněna po rysku destilovanou vodou a roztok byl důkladně promíchán.

3.7 Stanovení celkových anthokyanových barviv pH diferenciální metodou

3.7.1 Příprava roztoků

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

Na analytických vahách bylo naváženo 1,86 g KCl, navážka byla kvantitativně převedena destilovanou vodou do kádinky. Do kádinky bylo přidáno 980 ml destilované vody. Kádinka byla umístěna na magnetickou míchačku a do roztoku byla ponořena elektroda pH metru. Do roztoku byla po malých dávkách přidávána koncentrovaná kyselina chlorovodíková až do hodnoty pH 1,0. Pufír byl převeden do odměrné baňky na 1 000 ml a doplněn destilovanou vodou po rysku.

3.7.1.2 Tlumivý roztok octanu sodného o pH 4,5 a koncentraci 0,4 mol·l⁻¹

Na analytických vahách bylo naváženo 54,43 g octanu sodného, navážka byla kvantitativně převedena destilovanou vodou do kádinky. Do kádinky bylo přidáno 980 ml destilované vody. Kádinka byla umístěna na magnetickou míchačku a do roztoku byla ponořena elektroda pH metru. Do roztoku byla po malých dávkách přidávána koncentrovaná kyselina chlorovodíková až do hodnoty pH 4,5. Pufr byl převeden do odměrné baňky na 1 000 ml a doplněn destilovanou vodou po rysku.

3.7.2 Příprava vzorků a samotné měření

Vzorky bezových extraktů a koncentrátů byly ve zkumavkách naředěny destilovanou vodou podle intenzity zabarvení.

Do zkumavky bylo napipetováno 2,5 ml pufru chloridu draselného (0,025 mol·l⁻¹) a 0,5 ml naředěného vzorku. Do druhé zkumavky bylo napipetováno 2,5 ml pufru octanu sodného (0,4 mol·l⁻¹) a 0,5 ml naředěného vzorku. Zkumavky byly promíchány a každý připravený vzorek byl proměřen na spektrofotometru při vlnových délkách 510 nm a 700 nm. Jako slepý vzorek byla použita destilovaná voda. Každé stanovení bylo provedeno třikrát.

3.7.3 Výpočet

Majoritním anthokyanovým barvivem v černém bezu je kyanidin-3-glukosid a proto je ve výpočtu použita jeho molekulová hmotnost a molární absorpční koeficient [22]. Celková koncentrace anthokyanů, vyjádřená jako ekvivalent kyanidu-3-glukosidu (CGE) byla vypočtena z následující rovnice (7):

$$c_{MP} = \frac{A \cdot M \cdot F \cdot 10^3}{\varepsilon \cdot l} \quad 7$$

kde c_{MP} je výsledná koncentrace monomerního pigmentu ve vzorku (mg·l⁻¹),

A je výsledná hodnota absorbance vypočtená dle rovnice (8),

$$A = (A_{510} - A_{700})_{pH\ 1,0} - (A_{510} - A_{700})_{pH\ 4,5} \quad 8$$

M je molekulová hmotnost pro kyanidin-3-glukosid (449,2 g·mol⁻¹),

F je faktor ředění,

ε je molární absorpční koeficient pro kyanidin-3-glukosid (26 900 l·mol⁻¹·cm⁻¹),

l je délka dráhy průchodu světla vzorkem, což odpovídá délce kyvety (cm).

Celková koncentrace anthokyanů byla přepočtena na obsah anthokyanů ve vzorku v mg na 100 g sušených výlisků. V případě charakterizace výsledného produktu je uveden výsledek v mg·l⁻¹.

3.8 Refraktometrické stanovení rozpustné sušiny

Před měřením byla zkontrolována nulová poloha stupnice Abbeho refraktometru. Po odjištění hranolů byly plochy spodního i horního hranolu vyčištěny ethanolem a destilovanou vodou a vysušeny buničitou vatou. Na spodní hranol, který je ve vodorovné poloze, byla nanesena

destilovaná voda Pasteurovou pipetou a rozetřena po celé ploše skleněnou tyčinkou. Byl přiklopen horní hranol a zabezpečen klíčem. Sklon hranolů byl nastaven tak, aby rozhraní stínu a světla bylo v průsečíku nitkovitého kříže. Stupnice byla nastavena na nulu.

Hranoly byly osušeny a na spodní hranol ve vodorovné poloze byla nanesa kapka vhodně naředěného vzorku, která byla rozetřena skleněnou tyčinkou. Po ustálení teploty byl na stupnici odečten index lomu s přesností na čtyři desetinná místa. Stanovení každého vzorku bylo provedeno třikrát.

3.8.1 Výpočet

K odečtenému indexu lomu byla v tabulkách nalezena příslušná hodnota odpovídající množství sušiny vyjádřené v hmotnostních procentech sacharózy. Výsledné hodnoty byly přepočítány na původní vzorek vynásobením faktorem ředění.

3.9 Stanovení celkových fenolických látek metodou podle Folin-Ciocalteua

3.9.1 Příprava roztoků

3.9.1.1 Standardní roztok kyseliny gallové o koncentraci 1 g·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, kde byl roztok doplněn po rysku destilovanou vodou.

3.9.1.2 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.

3.9.2 Kalibrační řada

Byla připravena řada pěti kalibračních roztoku o koncentracích 1,5; 25; 50; 100 a 200 mg·l⁻¹. Do pěti odměrných baněk bylo postupně napipetováno 0,125; 0,25; 0,5; 1,0 a 2,0 ml standardního roztoku kyseliny gallové a doplněno destilovanou vodou po rysku.

Do zkumavek bylo napipetováno 1 ml desetkrát zředěného Folin-Ciocalteuova činidla, dále 1 ml destilované vody a 0,1 ml kalibračního standardu. Roztoky byly promíchány a ponechány stát 5 minut. Následně byl do každé zkumavky přidán 1,0 ml 7,5% roztoku uhličitanu sodného a obsah byl promíchán. Roztoky byly ponechány stát 15 minut v temnu 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.

3.9.3 Příprava vzorků a samotné měření

Vzorky bezových koncentrátů a 20% roztoky lyofilizátů byly ve zkumavkách naředěny destilovanou vodou dle intenzity zbarvení.

Do zkumavky bylo napipetováno 1 ml desetkrát zředěného Folin-Ciocalteuova činidla, dále 1 ml destilované vody a 0,1 ml roztoku vzorku. Roztoky byly promíchány a ponechány stát

5 minut. Následně byl do každé zkumavky přidán 1,0 ml 7,5% roztoku uhličitanu sodného a obsah byl promíchán. Roztoky byly ponechány stát 15 minut a poté byly proměřeny na spektrofotometru při vlnové délce 750 nm. Slepý vzorek byl připraven stejně, avšak místo vzorku byl přidán stejný objem destilované vody. Pro každý vzorek bylo provedeno stanovení třikrát.

3.9.4 Výpočet

Z rovnice regrese kalibrační křivky v příloze 4 byl vypočítán celkový obsah fenolických látek ve vzorcích jako ekvivalent kyseliny gallové (GAE) v $\text{ml}\cdot\text{l}^{-1}$.

3.10 Stanovení pH a titrovatelných kyselin

3.10.1 Příprava roztoků

3.10.1.1 Odměrný roztok hydroxidu sodného o koncentraci $0,25 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$

Na předvážkách bylo naváženo 10,00 g NaOH, který byl kvantitativně převeden destilovanou vodou do odměrné baňky na 1 000 ml. Po úplném rozpuštění hydroxidu sodného byla baňka doplněna destilovanou vodou po rysku. Odměrný roztok byl standardizován na kyselinu šťavelovou.

3.10.1.2 Standardní roztok kyseliny šťavelové o koncentraci $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$

Na analytických váhách bylo naváženo 1,2630 g dihydrátu kyseliny šťavelové. Navážka byla kvantitativně převedena destilovanou vodou do odměrné baňky na 100 ml a po úplném rozpuštění kyseliny šťavelové byla odměrná baňka doplněna destilovanou vodou po rysku.

Přesná koncentrace standardního roztoku kyseliny šťavelové byla vypočtena podle rovnice (9):

$$c_{\text{šťav}} = \frac{m}{M \cdot V} \quad 9$$

kde $c_{\text{šťav}}$ je koncentrace kyseliny šťavelové ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$),

m je přesná navážka dihydrátu kyseliny šťavelové (g),

M je molární hmotnost kyseliny šťavelové ($126,07 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$),

V je konečný objem roztoku v odměrné baňce (100 ml).

3.10.1.3 Standardizace odměrného roztoku hydroxidu sodného

Do titrační baňky bylo napipetováno 10,00 ml roztoku kyseliny šťavelové. K roztoku byly přidány 3 kapky fenolftaleinu a roztok byl titrován odměrným roztokem hydroxidu sodného do trvale růžového zbarvení. Standardizace byla provedena třikrát. Z průměrné spotřeby roztoku hydroxidu sodného při titraci byla vypočítána přesná koncentrace odměrného roztoku hydroxidu sodného podle rovnice (10):

$$c_{NaOH} = \frac{2 \cdot c_{šťav} \cdot V_{šťav}}{V_{NaOH}} \quad 10$$

kde c_{NaOH} je koncentrace odměrného roztoku hydroxidu sodného ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$),

$c_{šťav}$ je koncentrace roztoku kyseliny šťavelové ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$),

$V_{šťav}$ je objem roztoku kyseliny šťavelové, který byl použit k titraci (ml),

V_{NaOH} je spotřeba odměrného roztoku hydroxidu sodného (ml).

3.10.2 Příprava vzorků a samotné stanovení

Koncentráty extraktů z černého bezu a 20% roztoky lyofilizátů byly naředěny destilovanou vodou ve vhodném poměru.

Byla provedena kalibrace pH metru tlumivými roztoky o pH 7,00 a 4,00. Do kádinky bylo napipetováno 25 ml vzorku. Kádinka se vzorkem byla umístěna na magnetickou míchačku a do roztoku byla ponořena elektroda pH metru. Byla odečtena počáteční hodnota pH vzorku. Roztok byl za stálého míchání titrován odměrným roztokem hydroxidu sodného do pH 7,00. Stanovení bylo pro každý vzorek provedeno třikrát.

3.10.3 Výpočet

Celkový obsah titrovatelných kyselin byl vyjádřen jako ekvivalent kyseliny citronové (CAE). Pro výpočet byly použity rovnice (11 a 12):

$$c_{H^+} = \frac{c_{NaOH} \cdot V_{NaOH} \cdot F}{V_{vz}} \quad 11$$

$$c = \frac{c_{H^+} \cdot M}{3} \quad 12$$

kde c_{H^+} je koncentrace kyselých vodíkových iontů ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$),

c_{NaOH} je koncentrace odměrného roztoku hydroxidu sodného ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$),

V_{NaOH} je objem odměrného roztoku spotřebovaný při titraci (ml),

c je výsledná koncentrace kyseliny citronové ve vzorku ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$),

M je molární hmotnost kyseliny citronové ($192,13 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$).

Výsledná koncentrace titrovatelných kyselin byla vyjádřena jako ekvivalent kyseliny citronové v $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$.

3.11 Stanovení anthokyanových barviv kapalinovou chromatografií

3.11.1 Příprava mobilní fáze

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

vody a acetonitrilu v poměru 40:60 a její pH bylo opět upraveno na hodnotu 1,8 kyselinou mravenčí. Obě MF byly odplyněny v ultrazvukové lázni. Složení MF bylo zvoleno na základě dříve publikované diplomové práce [62].

Tabulka 10: parametry separace anthokyanů

MF A	(obj. %)	82
MF B	(obj. %)	18
průtok MF	(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

3.11.2 Separace vzorků

Vzorky i standardy byly eluovány izokratickou elucí s použitím mobilní fáze A a mobilní fáze B, které byly namíchány do požadovaného poměru pomocí směšovače. Parametry použité pro separaci jsou uvedeny v Tabulka 10. Byla použita kolona Kinetex® 5μm EVO C18 100 A, 250 × 4,6 mm. Vzorky koncentrátů a 20% roztoky lyofilizátů byly naředěny redestilovanou vodou. Vzorky i standardy byly dávkovány manuálně dávkovacím šesticestným kohoutem. Každý vzorek a každý bod kalibrační řady byl nadávkována třikrát.

3.11.3 Kalibrační křivka

Pro přípravu kalibrační křivky byl použit standardní roztok kyanidin-3-glukosidu. Barvivo o hmotnosti 1 mg bylo kvantitativně přeneseno do 10 ml odměrné baňky a ta byla doplněna redestilovanou vodou po rysku. Byl získán standardní roztok o koncentraci 0,1 mg·ml⁻¹, ze kterého byly ředěním připraveny koncentrace pro sestavení kalibrační křivky 0,10; 0,05; 0,025 mg·ml⁻¹.



Obrázek 12: kapalinový chromatograf Shimadzu

3.12 Statistické zpracování naměřených dat

Zpracování naměřených dat bylo provedeno pomocí počítačového programu Microsoft Excel. Každé měření vzorku bylo provedeno třikrát. Ze tří měření byl vypočten průměr, použitím funkce PRŮMĚR. Dále byla vypočtena směrodatná odchylka použitím funkce SMODCH a použitím funkce CONFIDENCE byla odchylka rozšířena pro interval spolehlivosti 95 %.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem praktické části diplomové práce byla extrakce výlisků z plodů černého bezu za účelem získání co největšího množství anthokyanových barviv s přihlédnutím k ekonomickému hledisku. Bylo proto nutné optimalizovat proces extrakce, jak z chemického, tak i z ekonomického hlediska. Získaný extrakt bylo nutné zakonzentrovat, aby jej bylo možné uchovávat a využívat v potravinářském průmyslu.

Ve výsledných produktech byly stanoveny vybrané chemické parametry:

- rozpustná sušina refraktometricky
- pH a titrační kyselost
- celkové fenolické látky Folin-Ciocalteuovou metodou
- obsah anthokyanových barviv kapalinovou chromatografií a pH diferenciální metodou

4.1 Stanovení zbytkové vlhkosti ve výliscích vysušených při 40 °C

Čerstvé výlisky bylo nutné uchovat do doby, než budou extrahovány. Proto byly usušeny, aby neplesnivěly a nekvasily. K sušení byla použita teplota 40 °C, aby bylo ve výliscích zachováno maximální množství biologicky aktivních látek. Postup sušení do konstantní hmotnosti je uveden v kapitole 3.3.1.

U výlisků vysušených na 40 °C byla stanovena zbytková vlhkost podle kapitoly 3.4 sušením na 105 °C do konstantní hmotnosti. Zbytková vlhkost činila $9,6 \pm 0,4$ %.

4.2 Optimalizace extrakce anthokyanových barviv z výlisků bezu černého

Voda jako extrakční činidlo byla zvolena z důvodu finanční nenáročnosti a dostupnosti. Voda je netoxická, nehořlavá a snadno dostupná, což ji činí ekologickým rozpouštědlem. V určitých procesech může voda nahradit organická rozpouštědla pro potravinářskou a farmaceutickou výrobu snížením nákladů a odstraněním ekologických problémů spojených s výrobou a likvidací organických rozpouštědel [58]. Jako druhé extrakční činidlo byla zvolena směs ethanol/voda v poměru 1:1. Ethanol, jako rozpouštědlo, je pro použití v potravinářském průmyslu taktéž použitelný a vhodný. Ačkoliv je ethanol považován za obecně bezpečné extrakční činidlo, jedná se o organické rozpouštědlo, které je potencionálně toxické a drahé pro využití v potravinářství. Voda jako extrakční činidlo tyto problémy obchází a může poskytnout přirozený prostředek pro izolaci anthokyanů, zejména pokud je účinnost extrakce zlepšena zvýšením teploty nebo přidáním oxidu siřičitého [25, 26].

Byla provedena série extrakcí s cílem zjistit nejvhodnější poměr výlisků ku rozpouštědlu.

Pro extrakci bylo zvoleno šest různých poměrů výlisků a rozpouštědla (výlisky m ku objemu V). Podle kapitoly 3.3.2 bylo 25,0 g výlisků postupně extrahováno 50 ml, 60 ml, 80 ml, 100 ml, 125 ml a 150 ml rozpouštědla. Výchozí teplota směsi ethanol/voda byla laboratorní, v případě extrakce vodou byla použita voda o laboratorní teplotě a voda o teplotě 95 °C. Všechny extrakce dále probíhaly za laboratorní teploty. Extrakce trvaly 13 hodin, tento čas byl zvolen po konzultaci se zadavatelem. V praxi by měly extrakce probíhat 12 a více hodin, pokud budou extrakce probíhat přes noc.

Jako parametr kvality extrakce bylo zvoleno množství obsažených anthokyanových barviv. Jejich celkový obsah v extraktech byl stanoven pH diferenciální metodou, která je popsána v kapitole 3.7.

Obsah anthokyanových barviv je ve všech tabulkách a grafech uveden jako ekvivalent monomerního pigmentu kyanidin-3-glukosidu (CGE), který je majoritním anthokyanem bezu černého [22].

Výsledky měření obsahu anthokyanových barviv v jednotlivých extraktech jsou uvedeny v následující tabulce 11.

Tabulka 11: obsah celkových anthokyanových barviv v jednotlivých extraktech

výlisky/rozpouštědlo (m/V)	CGE (mg·100 g ⁻¹ suchých výlisků)		
	voda 20 °C	voda 95 °C	voda/ethanol (1:1)
1:2	35,57 ± 2,10	35,35 ± 1,14	61,30 ± 1,50
1:2,4	44,74 ± 5,15	46,65 ± 0,73	65,26 ± 2,36
1:3,2	34,33 ± 1,46	39,13 ± 1,32	58,86 ± 0,66
1:4	33,19 ± 3,63	35,37 ± 1,41	44,32 ± 1,34
1:5	26,09 ± 1,58	31,67 ± 1,22	36,32 ± 2,02
1:6	22,79 ± 0,21	22,64 ± 1,23	26,58 ± 1,01

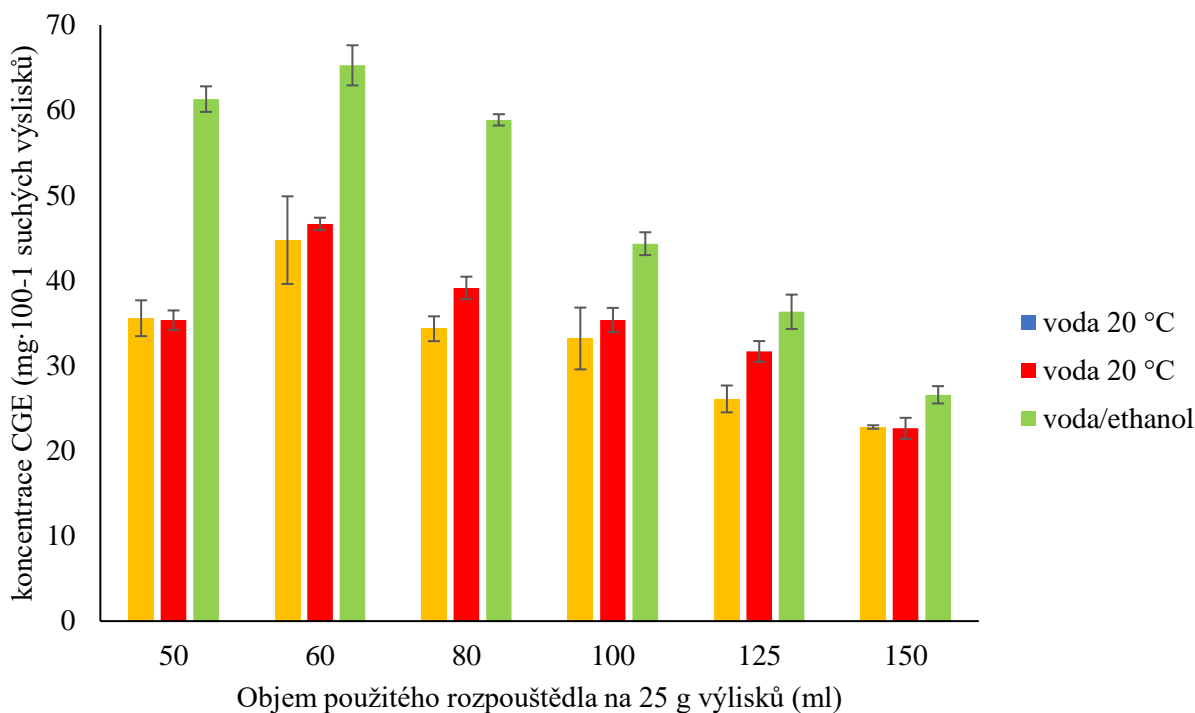
Z hodnot v tabulce 11 a z grafu 1 vyplývá, že nejvíce anthokyanových barviv se nachází v extraktu, kde je poměr výlisky ku rozpouštědlu 1:2,4. Se zvyšujícím se množstvím rozpouštědla množství anthokyanů klesá. Literatura taktéž uvádí, že se snižujícím se poměrem materiál/rozpouštědlo se zvyšuje množství vyextrahovaných barviv vlivem většího koncentračního gradientu, a tedy i rychlostí difúze. Nicméně při určitém objemu už k nárůstu nedochází [57].

V případě extrakce vodou s výchozí laboratorní teplotou je množství anthokyanů při poměru 1:2,4 (m/V) 44,74 ± 5,15 mg CGE·100 g⁻¹ suchých výlisků, v případě extrakce vodou s výchozí teplotou 95 °C je to 46,65 ± 0,73 mg CGE·100 g⁻¹ suchých výlisků. Literatura uvádí, že se zvýšenou teplotou vody jako extrakčního činidla se zvyšuje účinnost extrakce, usnadňuje se uvolňování fenolických látek z rostlinných vzorků, zvyšuje se rychlost rozpouštění fenolických látek v rozpouštědle a zvyšuje se difuzní koeficient, který zvyšuje rychlost extrakce a zkracuje dobu extrakce [26]. Toto se při optimalizaci výchozí teploty vody pro extrakci nepotvrdilo, nicméně rozdíl by byl pravděpodobně zaznamenán v případě, že by se zvýšená teplota udržovala po celou dobu extrakce. Literatura taktéž uvádí, že teplota vyšší než 70 °C může způsobit rychlou degradaci a odbarvení anthokyanů [26], takže by byl výsledek pravděpodobně ovlivněn úbytkem těchto látek působením zvýšené teploty.

Při extrakci směsí voda/ethanol v poměru 1:1 byla koncentrace anthokyanů v extraktu s poměrem výlisků ku rozpouštědlu 1:2,4 65,26 ± 2,36 mg CGE·100 g⁻¹ suchých výlisků. Tento

výsledek je znatelně vyšší než při extrakci vodou. Ethanol je tedy lepším extrakčním činidlem pro extrakci anthokyanových barviv než voda, což uvádí i literatura [59].

Z výsledků vyplývá, že pro získání extraktu s nejvyšším obsahem anthokyanových barviv je vhodné použít poměr výlisky ku rozpouštědлу 1:2,4 (m/V) a jako rozpouštědlo směs ethanolu a vody.



Graf 1: Koncentrace celkových anthokyanů v závislosti na objemu rozpouštědla pro dvě různé výchozí teploty rozpouštědla

4.3 Optimalizace teploty vodní lázně při přípravě koncentrátů na vakuové odparce

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

Byl připraven extrakt bezových výlisků podle kapitoly 3.3. Jako rozpouštědlo byla použita směs ethanolu a vody v poměru 1:1. Z tohoto extraktu bylo použito vždy 100 ml pro přípravu koncentráту při různých teplotách vodní lázně odparky: 40 °C, 60 °C, 75 °C a 85 °C podle kapitoly 3.5. Koncentrování extraktů trvalo ve všech případech 20 minut.

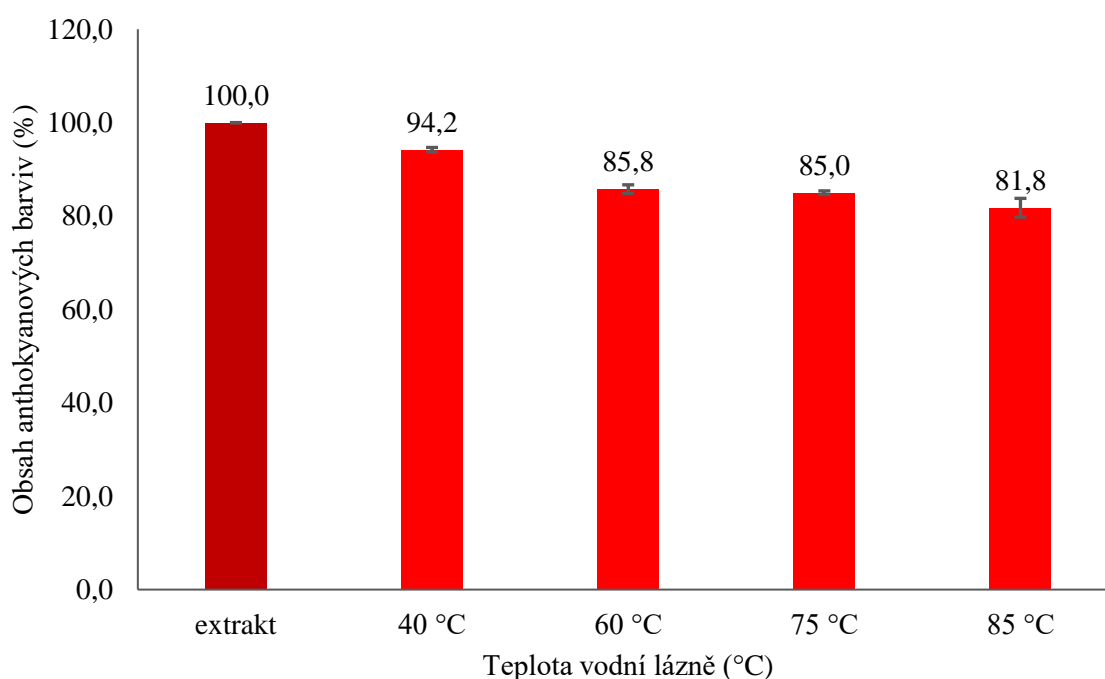
K posouzení míry degradace anthokyanových barviv byla použita pH diferenciální metoda. Obsah anthokyanových barviv byl stanoven ve výchozím extraktu a ve všech koncentrátech. Rozdíl získaných koncentrací anthokyanů byl vyhodnocen jako množství barviv, která podlehla degradaci a byl vyjádřen v procentech. Degradace barviv v procentech pro různé teploty vodní lázně vakuové odparky je včetně intervalů spolehlivosti na hladině statistické významnosti 0,05 uvedena v tabulce 12.

Tabulka 12: degradace barviv v procentech pro různé teploty vodní lázně vakuové odparky

Teplota (°C)	CGE _(E) - CGE _(K) (%)*
40	5,8 ± 0,5
60	14,8 ± 0,9
75	15,0 ± 0,4
85	18,2 ± 2,0

*CGE_(E) je celkový obsah anthokyanů v extraktu vyjádřený jako kyanidin-3-glukosid ekvivalent a CGE_(K) je celkový obsah anthokyanů v koncentrátu vyjádřený jako kyanidin-3-glukosid ekvivalent

Procentuální úbytek barviv pro všechny teploty vodní lázně je graficky znázorněn v grafu 2. Z grafu je patrné, že při rostoucí teplotě vodní lázně se zvyšuje i degradace barviv. Při teplotě 40 °C je úbytek barviv 5,8 ± 0,5 %, při teplotě 85 °C už je to 18,2 ± 2,0 %. Szalóki-Dorkó a spol. (2016) uvádí, že při přípravě koncentráту z bezu černého odrůdy Haschberg a Samocca došlo při odpařování na rotační vakuové odparce (200 mbar) ke ztrátě přibližně 10 % anthokyanových barviv [60].



Graf 2: obsah anthokyanů před a po odpařování vyjádřený v procentech

Na základě těchto výsledků byla teplota 40 °C případně nižší vyhodnocena jako nejvhodnější teplota pro získání koncentráту vakuovou odparkou.

4.4 Příprava koncentrátů, lyofilizátů a stanovení vybraných chemických charakteristik

Tabulka 13: označení vzorků

označení extraktu		označení příslušného koncentrátu nebo lyofilizátu z extraktu	
extrakt voda/ethanol	E1	koncentrát	K1
extrakt voda/ethanol	E2	koncentrát	K2
extrakt voda	E3	koncentrát	K3
extrakt voda	E4	koncentrát	K4
extrakt voda	E5	lyofilizát	L1
extrakt voda	E6	lyofilizát	L2

Příprava koncentrátů

Na základě výsledků optimalizace teploty vodní lázně (kapitola 4.3) vakuové odparky byly připraveny koncentráty z extraktů, které byly připraveny podle kapitoly 3.3.2. Pro zakoncentrování extraktu na vakuové odparce s vodní vývěvou byl použit extrakt, který byl připraven extrakcí výlisků směsí voda/ethanol. A pro zakoncentrování extraktu na rotační vakuové odparce s membránovou vývěvou byl použit extrakt, který byl připraven extrakcí výlisků vodou.

Teplota vodní lázně při koncentrování vodného extraktu byla 35 °C a při koncentrování extraktu voda/ethanol 40 °C. Ve všech případech bylo k zakoncentrování použito 100 ml extraktu a výsledný objem koncentrátu byl 18 ml. Zakoncentrování extraktů bylo provedeno podle kapitoly 3.5. Příprava koncentrátů extraktů byla provedena dvakrát včetně přípravy daných extraktů z plodů bezu černého, kvůli ověření přesnosti zvolených metod.

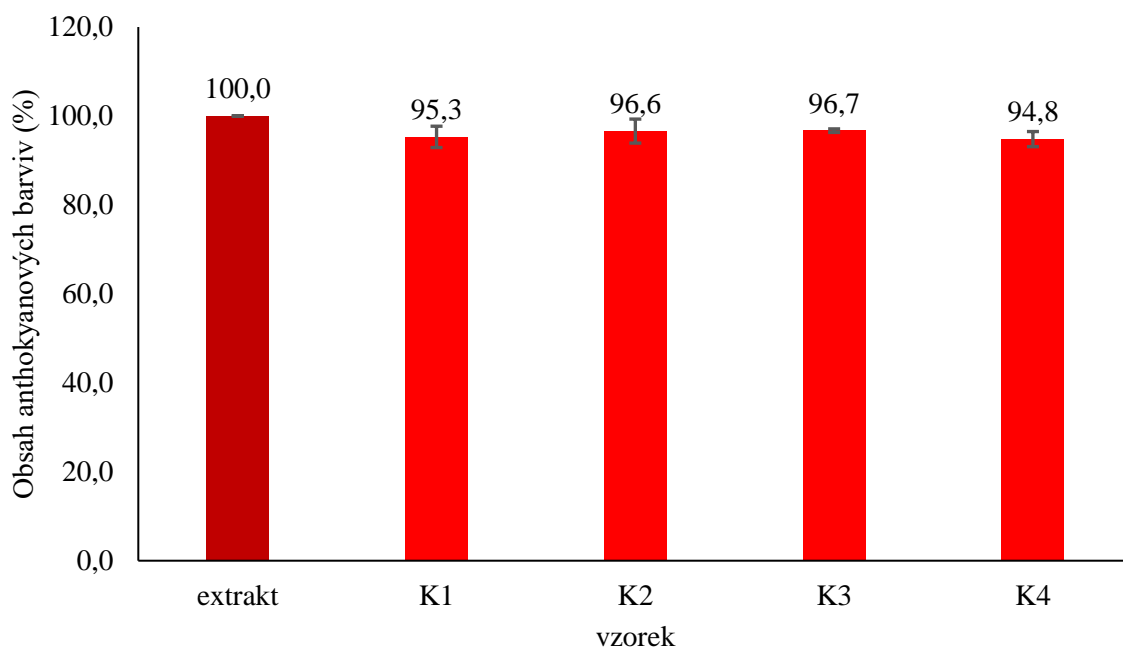
U připravených koncentrátů byla zjištěna degradace anthokyanových barviv. Pro stanovení celkových anthokyanových barviv byla použita pH diferenciální metoda. Obsah anthokyanů byl stanoven ve všech extraktech a příslušných koncentrátech. Rozdíl získaných koncentrací anthokyanových barviv byl vyhodnocen jako množství barviv, která podlehla degradaci a byl vyjádřen v procentech v tabulce 14.

Tabulka 14: degradace barviv v procentech pro vzorky koncentrátů

vzorek	$CGE_{(E)} - CGE_{(K)} (\%)*$
K1	$4,7 \pm 2,4$
K2	$3,4 \pm 2,7$
K3	$3,3 \pm 1,7$
K4	$5,2 \pm 1,7$

*CGE_(E) je celkový obsah anthokyanů v extraktu vyjádřený jako kyanidin-3-glukosid ekvivalent a CGE_(K) je celkový obsah anthokyanů v koncentrátu vyjádřený jako kyanidin-3-glukosid ekvivalent

Procentuální úbytek barviv pro všechny vzorky koncentrátů je graficky znázorněn v grafu 3. Průměrná procentuální degradace barviv v připravených koncentrátech je $4,2 \pm 1,5 \%$.



Graf 3: obsah anthokyanů před a po odpaření na rotační vakuové odparce

Příprava lyofilizátů

Pro přípravu lyofilizátu podle kapitoly 3.6 byl použit vodný extrakt. Objem lyofilizovaného extraktu byl přesně změřen a výsledný lyofilizát zvážen, tyto údaje jsou uvedeny v tabulce 15. Příprava lyofilizátů extraktů byla provedena dvakrát včetně přípravy daných extraktů z plodů bezu černého, kvůli ověření přesnosti zvolených metod.

Tabulka 15: výsledná hmotnost lyofilizátů

vzorek	objem extraktu (ml)	hmotnost lyofilizátu (g)
L1	343	10,81
L2	226	7,17

Stanovení vybraných charakteristik

Ve výsledných produktech (koncentráty a lyofilizáty) byly stanoveny následující vybrané charakteristiky:

- refraktometrická sušina
- pH
- celková titrační kyselost
- celkový obsah fenolických látek
- celkový obsah anthokyanových barviv

Výsledné charakteristiky koncentrátů se vztahují k 5,6krát zahuštěným extraktům, což je 18 ml koncentrátu připraveného ze 100 ml extraktu. Výsledné charakteristiky lyofilizátů byly stanoveny ve 20% roztocích lyofilizátů a všechny výsledky stanovovaných charakteristik byly přepočítány na 1 g lyofilizátu.

4.4.1 Stanovení refraktometrické sušiny

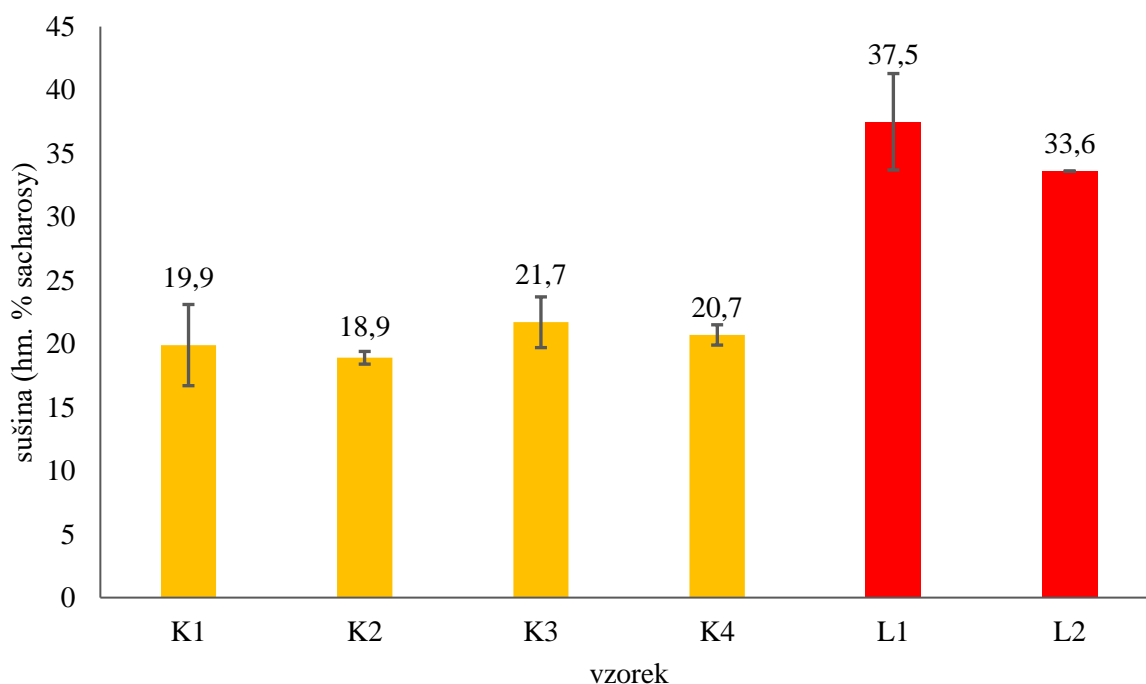
Ve výsledných koncentrátech a lyofilizátech byla stanovena refraktometricky rozpustná sušina podle kapitoly 3.8.

Pro každý vzorek byl na refraktometru odečten index lomu třikrát a v tabulkách byla nalezena příslušná hodnota rozpustné sušiny. Výsledek je uveden jako hm. % sacharosy s hodnotou intervalu spolehlivosti na hladině statistické významnosti 0,05.

Výsledné hodnoty rozpustné sušiny pro koncentráty jsou uvedeny v tabulce 16 a znázorněny v grafu 4.

Tabulka 16: výsledky stanovení refraktometrické sušiny v koncentrátech a lyofilizátech

vzorek	hm. % sacharosy
K1	19,9 ± 3,2
K2	18,9 ± 0,5
K3	21,7 ± 2,0
K4	20,7 ± 0,8
L1	37,5 ± 3,8
L2	33,6 ± 0,0



Graf 4: Obsah refraktometricky stanovené rozpustné sušiny v koncentrátech a lyofilizátech

Z grafického znázornění je patrné, že obsah rozpustné sušiny v koncentrátech je velice podobný ať už se jedná o koncentrát vodného extraktu nebo extraktu s rozpouštědlem voda/ethanol. Obsah rozpustné sušiny lyofilizátů je také podobný a to $33,6 \pm 0,0$ hm. % sacharosy a $37,5 \pm 3,8$ hm. % sacharosy.

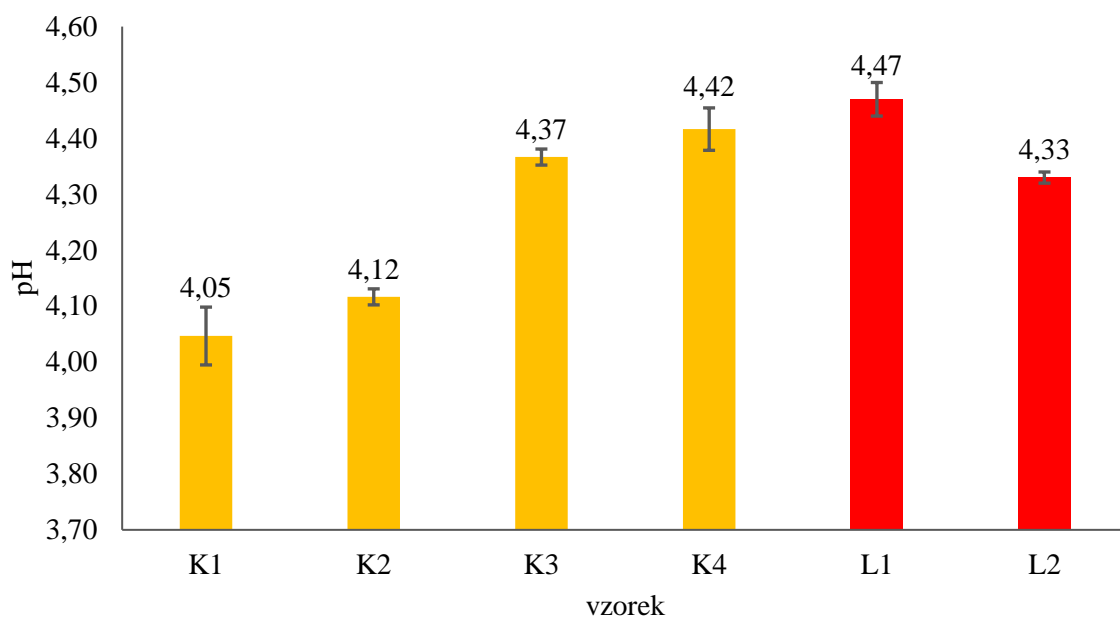
4.4.2 Stanovení aktivní kyselosti a titrační kyselosti

pH a titrační kyselost byla stanovena ve vzorcích výsledných koncentrátů a lyofilizátů podle kapitoly 3.10. Obsah titrovatelných kyselin je uveden jako ekvivalent kyseliny citronové (CAE) v $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

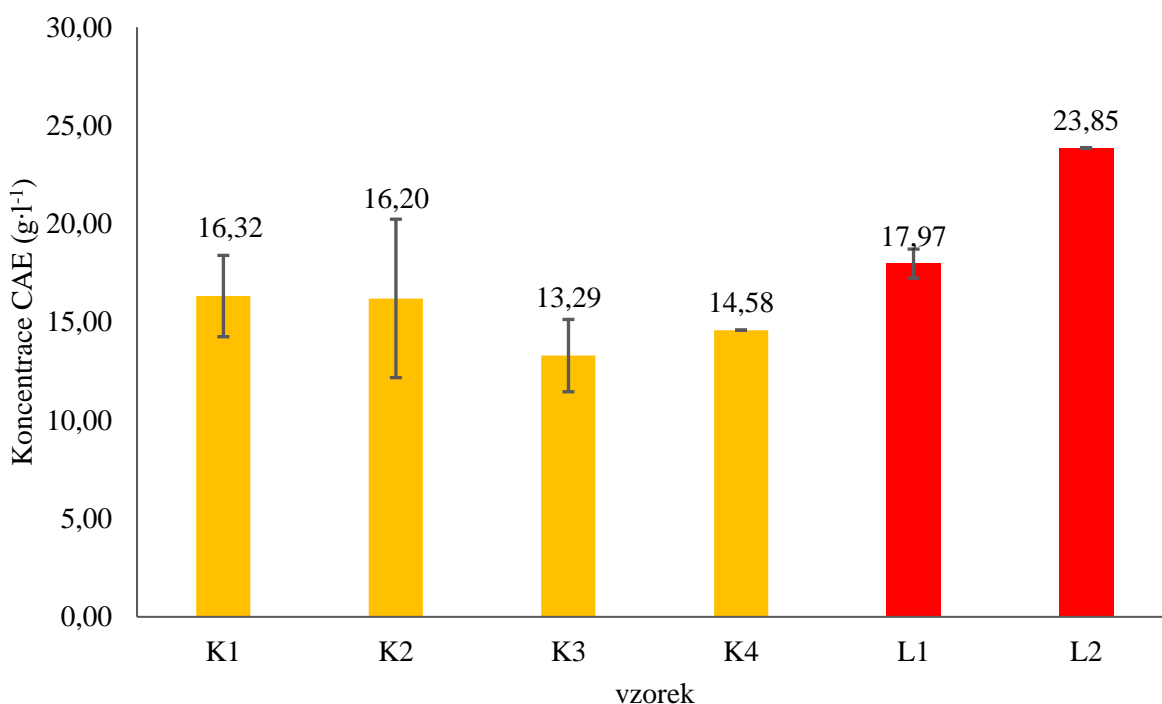
Výsledné hodnoty pH vzorků a jejich titrační kyselost jsou uvedeny v tabulce 17 a srovnány v grafu 5 a grafu 6.

Tabulka 17: Výsledky pH a titrační kyselosti koncentrátů a lyofilizátů

vzorek	pH	CAE ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)
K1	$4,05 \pm 0,05$	$16,32 \pm 2,07$
K2	$4,12 \pm 0,01$	$16,20 \pm 4,03$
K3	$4,37 \pm 0,01$	$13,29 \pm 1,84$
K4	$4,42 \pm 0,04$	$14,58 \pm 0,00$
L1	$4,47 \pm 0,03$	$17,97 \pm 0,74$
L2	$4,33 \pm 0,01$	$23,85 \pm 0,00$



Graf 5: pH koncentrátů a lyofilizátů



Graf 6: titrační kyselost koncentrátů a lyofilizátů vyjádřená jako ekvivalent kyseliny citronové

Naměřené hodnoty pH koncentrátů se pohybovaly v rozsahu $4,05 \pm 0,05$ až $4,42 \pm 0,04$. Koncentráty připraveny z extraktu ethanol/voda měly pH nižší než koncentráty, které byly připraveny z vodného extraktu. V případě extrakce směsí vody a ethanolu se pravděpodobně extrahovalo více látek mající kyselý charakter, což potvrzuje u koncentrátů i celková koncentrace titrovatelných kyselin vyjádřená jako ekvivalent kyseliny citronové. Koncentráty s nižším pH mají celkový obsah titrovatelných kyselin $16,32 \pm 2,07 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a $16,20 \pm 4,03 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$

a koncentráty s vyšším pH mají obsah titrovatelných kyselin $13,29 \pm 1,84 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a $14,58 \pm 0,00 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. pH lyofilizátů bylo $4,47 \pm 0,03$ a $4,33 \pm 0,01$ a obsah titrovatelných kyselin byl vyšší než u koncentrátů, a to $17,97 \pm 0,74 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a $23,85 \pm 0,00 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$.

4.4.3 Stanovení celkového obsahu fenolických látek

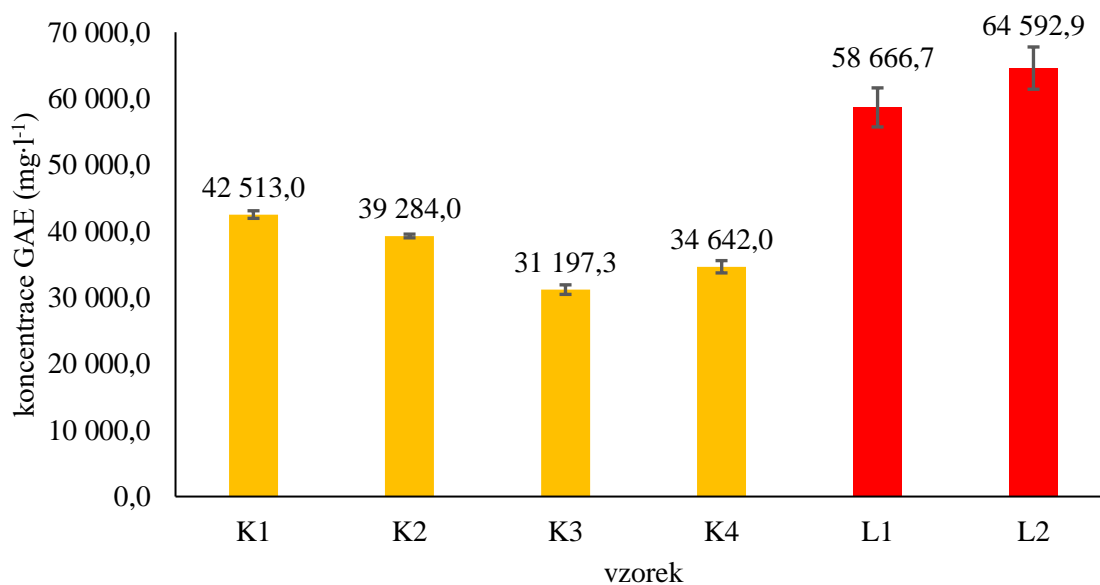
Ke stanovení celkových fenolických látek ve výsledných koncentrátech a lyofilizátech byla použita Folin-Ciocalteua metoda podle kapitoly 3.9.

Ze standardu kyseliny gallové byla připravena kalibrační řada postupem v kapitole 3.9.2. Z naměřených hodnot byla sestavena kalibrační křivka, která je zobrazena v příloze 4. Ve studovaném rozsahu je tato závislost lineární, regresní koeficient je 0,993. Z regresní rovnice kalibrační křivky byl vypočítán celkový obsah fenolických látek ve vzorcích.

Celkový obsah fenolických látek je uveden v tabulce 18 a v grafu 7 jako ekvivalent kyseliny gallové (GAE) v $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ s hodnotou intervalu spolehlivosti na hladině statistické významnosti 0,05.

Tabulka 18: Celková koncentrace fenolických látek ve vzorcích koncentrátů a lyofilizátů

vzorek	GAE ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)
K1	$42\,513,0 \pm 574,4$
K2	$39\,284,0 \pm 281,1$
K3	$31\,197,3 \pm 720,4$
K4	$34\,642,0 \pm 926,2$
L1	$58\,666,7 \pm 2\,944,2$
L2	$64\,592,9 \pm 3\,187,2$



Graf 7: Celková koncentrace fenolických látek

Z výsledných koncentrací fenolických látek ve vzorcích koncentrátů je patrné, že koncentrace v K1 a K2 (extrakty ethanol/voda) je vyšší než koncentrace v K3 a K4 (extrakty voda). Tento rozdíl je způsobený tím, že pro extrakci fenolických látek je ethanol lepším extrakčním činidlem než voda [59]. Obsah fenolických látek ve vzorcích lyofilizátů byl 58,7 a 64,6 g·l⁻¹.

Literatura uvádí celkový obsah fenolických látek stanovený Folin-Ciocalteuovou metodou v komerčním koncentrátu šťávy bezu černého (*Sambucus nigra L.*, Böcker Iberian, Německo) 30,5 ± 0,4 g·l⁻¹ [61]. Koncentrace celkových fenolických látek v této práci je o něco vyšší v případě koncentrátů z vodných extraktů 31,2 ± 0,7 g·l⁻¹ a 34,6 ± 0,9 g·l⁻¹. V případě koncentrátů z extraktu ethanol/voda je již koncentrace o dost vyšší a to 39,3 ± 0,3 g·l⁻¹ a 42,5 ± 0,6 g·l⁻¹. Lze tedy říct, že příprava koncentrátů z extraktu bezových výlisků má s ohledem na obsah fenolických látek smysl.

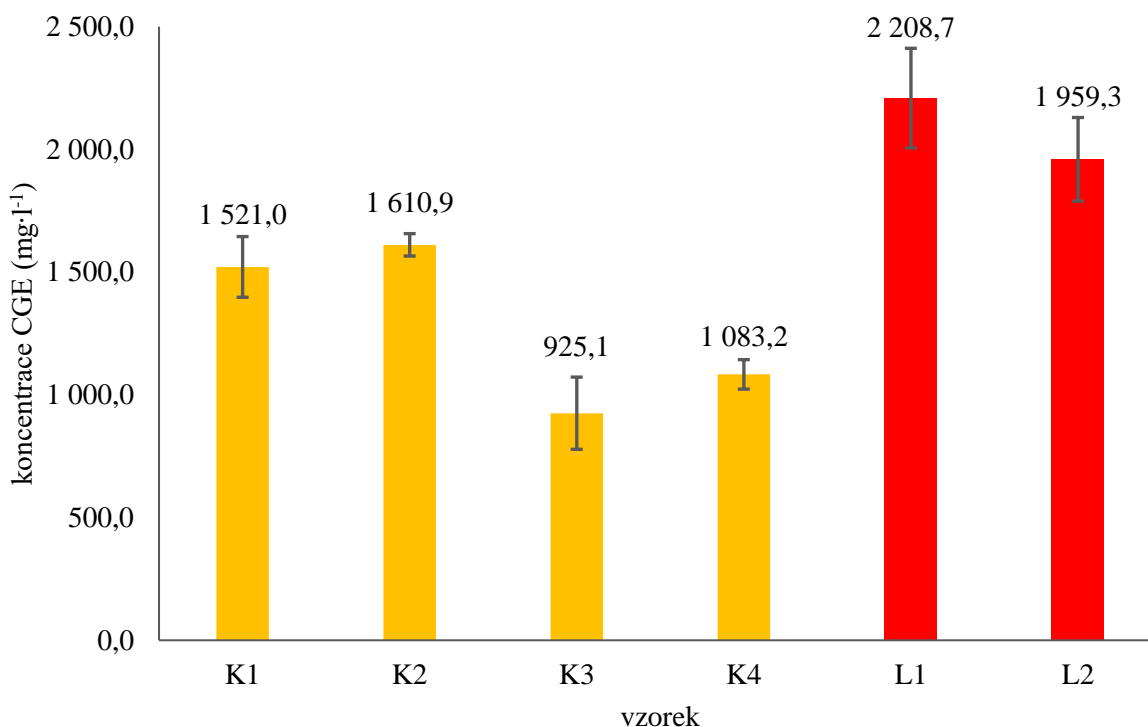
4.4.4 Stanovení celkových anthokyanů pH diferenciální metodou

Celkové anthokyany byly stanoveny pH diferenciální metodou popsanou v kapitole 3.7. Jako ekvivalent monomerního pigmentu byla pro přepočítání použita molekulová hmotnost kyanidin-3-glukosidu (CGE), který je majoritním pigmentem černého bezu.

Pro každý vzorek bylo stanovení provedeno třikrát a z výsledných hodnot byla vypočítána průměrná hodnota včetně hodnoty intervalů spolehlivosti na statistické významnosti 0,05. Výsledná hodnota byla vyjádřena jako ekvivalent kyanidinu-3-glukosidu CGE v mg·l⁻¹. Hodnoty jsou uvedeny v tabulce 19 a vyneseny do grafu 8.

Tabulka 19: Obsah anthokyanových barviv v koncentrátech a lyofilizátech

vzorek	CGE (mg·l ⁻¹)
K1	1 521,0 ± 123,7
K2	1 610,9 ± 45,7
K3	925,1 ± 147,1
K4	1 083,2 ± 60,0
L1	2 208,7 ± 202,8
L2	1 959,3 ± 170,3

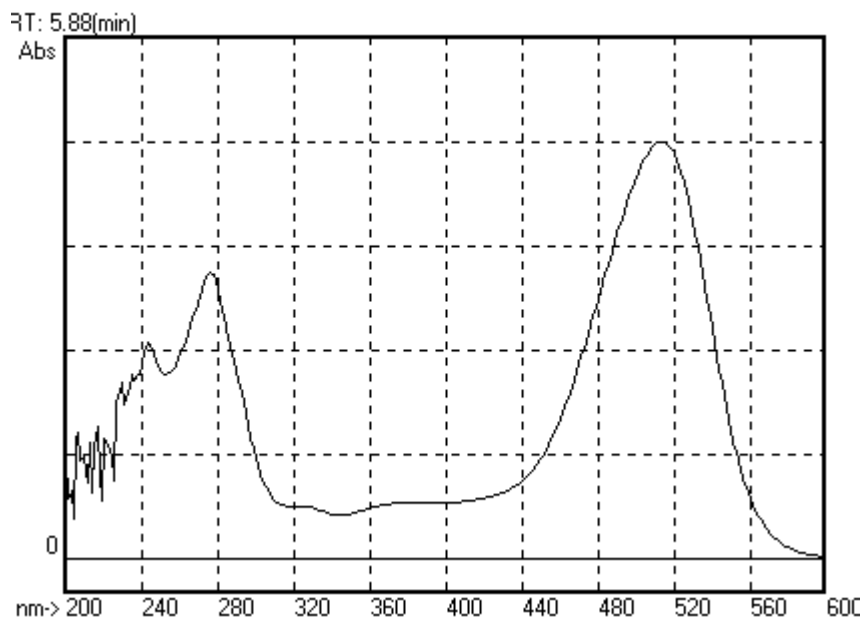


Graf 8: Celkový obsah anthokyanových barviv v koncentrátech a lyofilizátech

Z grafického znázornění obsahu anthokyanových barviv v koncentrátech je patrné, že koncentrát K1 a K2 (extrakty voda/ethanol) mají vyšší obsah anthokyanových barviv než koncentráty K3 a K4 (extrakty voda). Tento rozdíl je způsobený tím, že pro extrakci anthokyanů je ethanol lepším extrakčním činidlem než voda [59]. Vzorky lyofilizátů obsahovali 2,2 a 2,0 mg·l⁻¹ anthokyanových barviv.

4.4.5 HPLC analýza anthokyanových barviv

Anthokyanová barviva obsažená ve výsledných koncentrátech a lyofilizátech byla separována na koloně Kinetex® EVO C18 Core-Shell zapojené v kapalinovém chromatografu Shimadzu. Byla vyhodnocována detektorem s diodovým polem při vlnové délce 520 nm, tato vlnová délka umožňovala stanovení všech analytů v jejich absorpčním maximu spektra, absorpční spektrum pro kyanidin-3,5-diglukosid je na obrázku 13. Obsažená barviva byla kvantifikována srovnáním se standardem. Jako standard byl k dispozici kyanidin-3-glukosid (C3G).



Obrázek 13: absorpční spektrum kyanidin-3,5-diglukosid

4.4.5.1 Optimalizace izokratické eluce

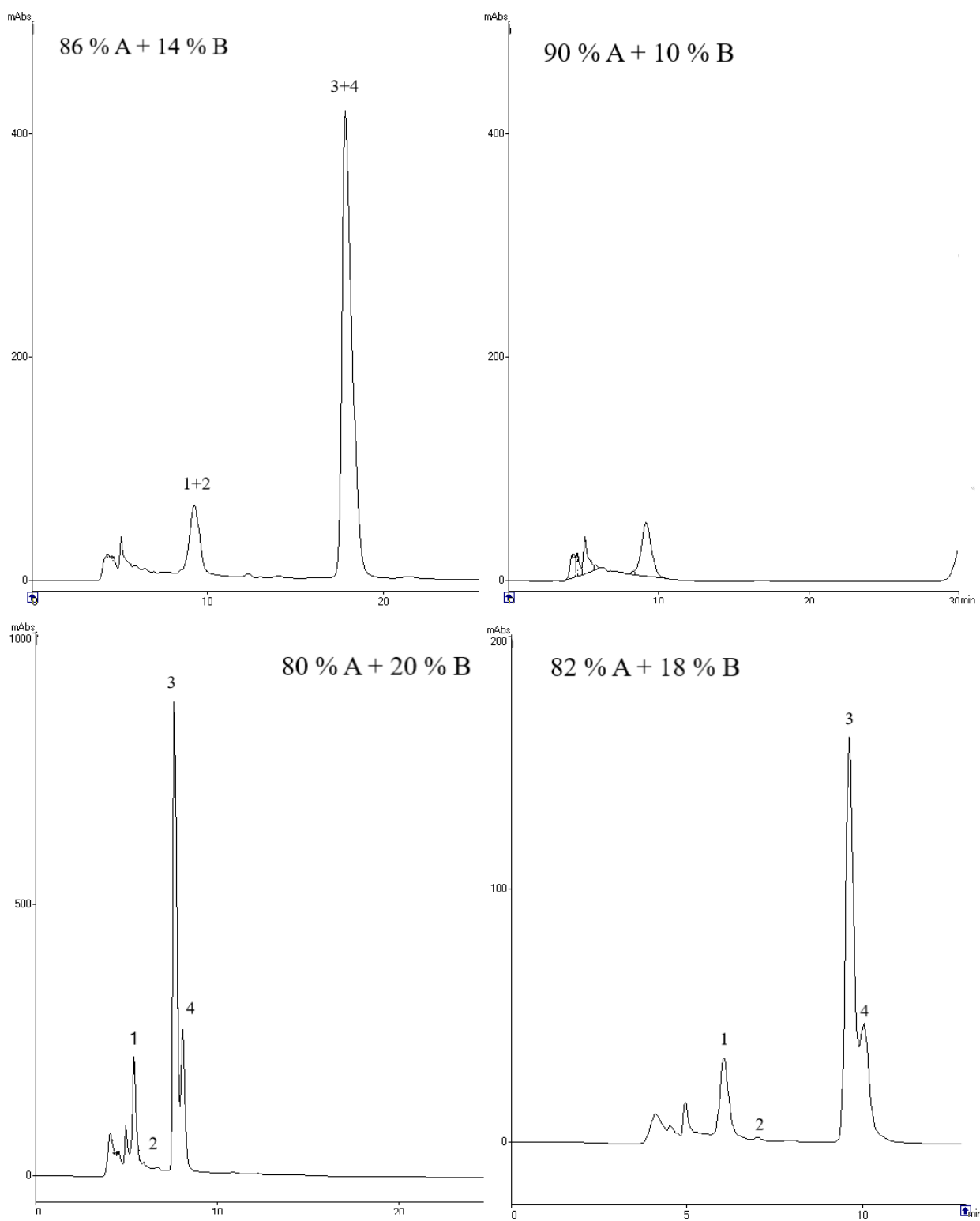
Byl optimalizován poměr mobilních fází A a B při izokratické eluci. Mobilní fáze byly připraveny podle kapitoly 3.11.1. Pro optimalizaci byl použit naředěný a přefiltrovaný koncentrát K1.

Výchozí poměr mobilních fází A a B vycházel z diplomové práce Ing. Loškové [62], která zvolila 86 % MF A a 14 % MF B. V tomto případě trvala analýza více než 20 minut a nedošlo k úplnému rozdělení barviv, což je viditelné na prvním chromatogramu na obrázku 14.

Jelikož nedošlo k rozdělení barviv, byl zvolen jiný poměr mobilních fází a to 90 % MF A a 10 % MF B. V tomto případě taktéž nedošlo k dokonalému rozdělení barviv, a navíc se čas separace výrazně prodloužil, což je patrné na druhém chromatogramu na obrázku 14.

Dále byl zvolen poměr mobilních fází: 80 % MF A a 20 % MF B. V tomto případě se čas analýzy výrazně zkrátil a to pod 10 minut, barviva od sebe byla oddělena a píky byly ostré. Nicméně zde došlo k horšímu oddělení čtvrtého píku od píku předešlého. Výsledek analýzy je na třetím chromatogramu na obrázku 14.

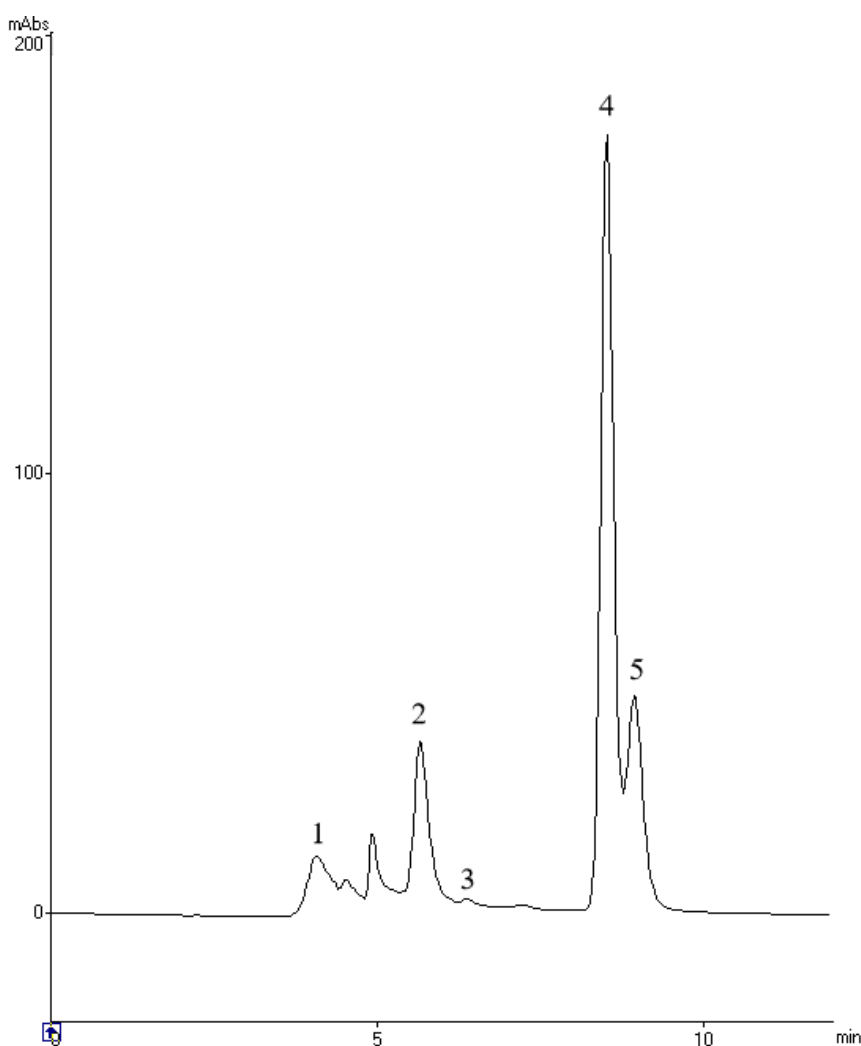
Jako optimální poměr mobilních fází, byl zvolen poměr 82 % MF A a 18 % MF B. Analýza při tomto poměru mobilních fází trvala 12 minut, barviva se od sebe oddělila a ostrost píků byla poměrně slušná. Při tomto poměru mobilních fází byl prověřován i jiný průtok MF než $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, nicméně nedocházelo k dokonalejšímu rozdělení, proto byl původní průtok ponechán. Výsledek optimalizace je na čtvrtém chromatogramu na obrázku 14.



Obrázek 14: chromatogramy pro různé poměry mobilních fází A a B

4.4.5.2 Kalibrační křivka

Kalibrační závislost byla sestavena pro jeden standard: kyanidin-3-glukosid podle kapitoly 3.11.3. Standard byl nadávkován samostatně, pro pověření retenčního času, který mu byl následně přiřazen v případě nástřiku směsi. V tabulce 32 v příloze 8 jsou uvedeny hodnoty plochy píků jednotlivých bodů kalibrace. Z uvedených hodnot byla sestrojena závislost plochy píku na koncentraci barviva v roztoku, závislost je uvedena v příloze 8. Retenční čas byl také prověřen pro standard kyanidin-3,5-diglukosid, kalibrační řada pro tento pigment nebyla sestavena, protože koncentrace tohoto anthokyanu byla ve vzorcích příliš malá a byla tedy zanedbávána.



Obrázek 15: HPLC chromatogram koncentrátu K1 při 520 nm (1: mrtvý objem; 2: kyanidin-3-sambubiosid-5-glukosid; 3: kyanidin-3,5-diglukosid; 4: kyanidin-3-sambubiosid; 5: kyanidin-3-glukosid)

Z regresní rovnice kalibrační křivky, která je uvedena v příloze 8 bylo vypočítáno množství jednotlivých barviv v koncentrátu a lyofilizátu. Jelikož nebyl k dispozici standard kyanidinu-3-sambubiosidu a kyanidin-3-sambubiosid-5-glukosidu byla jejich koncentrace vypočítána z kalibrační křivky kyanidinu-3-glukosidu a koncentrace byla uvedena jako ekvivalent

kyanidin-3-glukosidu (CGE). Koncentrace kyanidin-3,5-diglukosidu byla zanedbávána, jelikož se tento pigment ve vzorku vyskytoval ve velmi nízkých koncentracích.

4.4.5.3 Stanovení obsahu majoritních barviv v koncentrátech a lyofilizátech

V bezových koncentrátech a lyofilizátech byla provedena separace obsažených anthokyanových barviv a pomocí externího standardu barviva byla provedena kvantifikace. Parametry a provedení HPLC analýzy byly popsány v kapitole 3.11. Hodnoty obsahu anthokyanových barviv ve vzorcích jsou uvedeny s hodnotou intervalu spolehlivosti na hladině statistické významnosti 0,05 v tabulce 20, tabulce 21 a v tabulce 22.

Tabulka 20: průměr retenčních časů, plochy píků a výsledné koncentrace uvedené jako CGE pro koncentráty K1 a K2, které byly připraveny z extraktu ethanol/voda

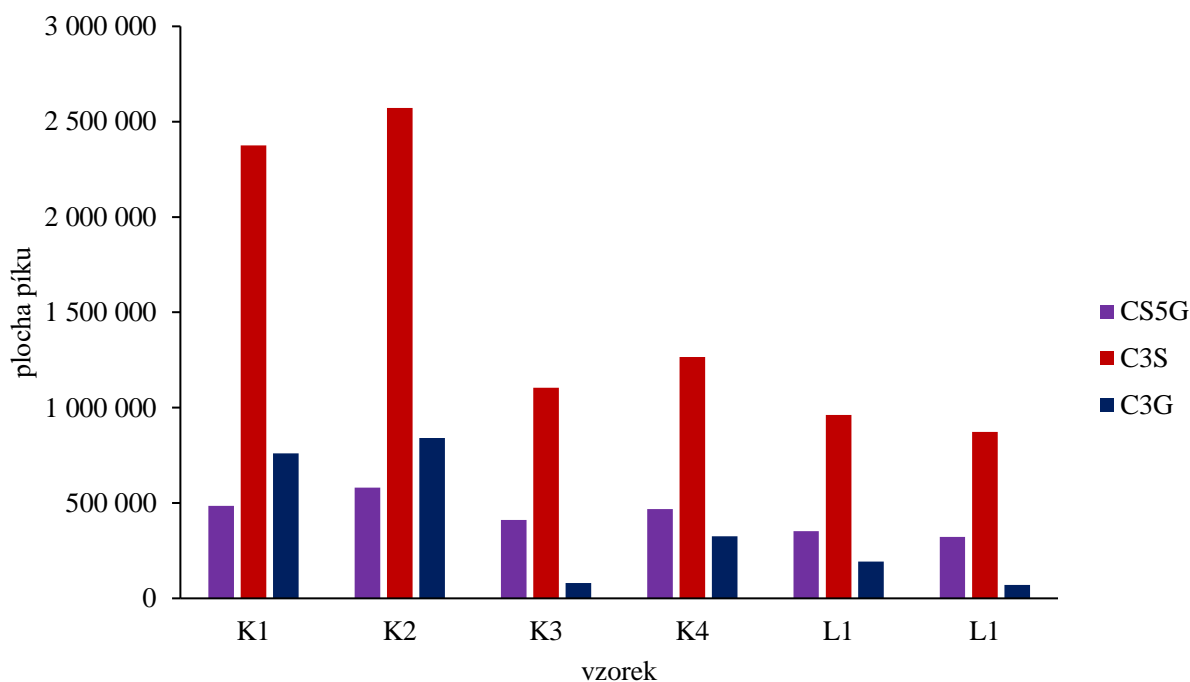
	barvivo	t _R (min)	plocha píku	c (mg·l ⁻¹)		barvivo	t _R (min)	plocha píku	c (mg·l ⁻¹)
K1	C3S5G	5,9	485134	335,5 ± 32,9	K2	C3S5G	5,9	581489	401,8 ± 13,4
	C3G	9,4	2375312	1636,5 ± 82,8		C3G	9,2	2572692	1772,3 ± 64,8
	C3G	9,9	760919	525,3 ± 27,1		C3G	9,7	841471	580,7 ± 37,8

Tabulka 21: průměr retenčních časů, plochy píků a výsledné koncentrace uvedené jako CGE pro koncentráty K3 a K4, které byly připraveny z vodného extraktu

	barvivo	t _R (min)	plocha píku	c (mg·l ⁻¹)		barvivo	t _R (min)	plocha píku	c (mg·l ⁻¹)
K3	C3S5G	5,8	411067	284,5 ± 5,3	K4	C3S5G	5,8	468046	323,7 ± 5,6
	C3G	9,1	1105274	762,3 ± 38,3		C3G	9,1	1265132	872,3 ± 35,6
	C3G	9,6	81159	57,4 ± 2,6		C3G	9,5	324770	225,1 ± 1,8

Tabulka 22: průměr retenčních časů, plochy píků a výsledné koncentrace uvedené jako CGE pro lyofilizáty L1 a L2, které byly připraveny z vodného extraktu

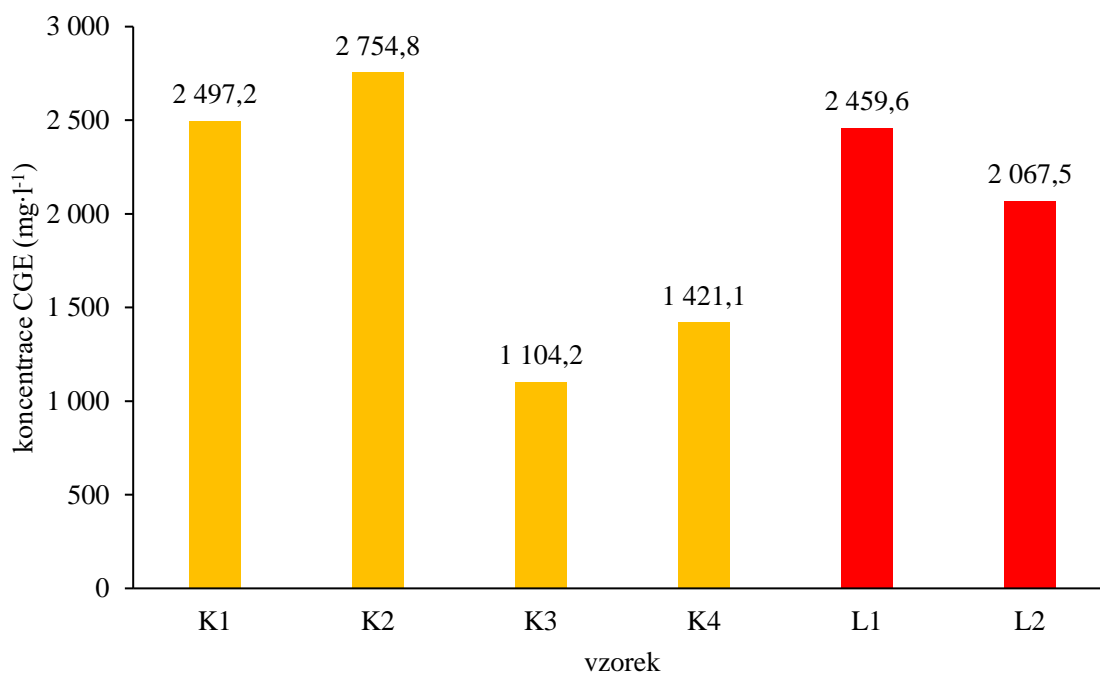
	barvivo	t _R (min)	plocha píku	c (mg·l ⁻¹)		barvivo	t _R (min)	plocha píku	c (mg·l ⁻¹)
L1	C3S5G	5,8	352040	575,8 ± 16,2	L2	C3S5G	5,8	322101	527,1 ± 57,1
	C3G	9	962110	1567,2 ± 36,3		C3G	8,9	873695	1423,5 ± 34,5
	C3G	9,4	192552	316,6 ± 19,7		C3G	9,4	69646	116,9 ± 9,7



Graf 9: plochy píků jednotlivých anthokyanů ve vzorcích

Tabulka 23: suma koncentrací jednotlivých pigmentů ve vzorcích koncentrátů a lyofilizátů uvedená jako CGE

vzorek	K1	K2	K3	K4	L1	L2
c (mg·l ⁻¹)	2497,2	2754,8	1104,2	1421,1	2459,6	2067,5



Graf 10: koncentrace anthokyanových barviv v koncentrátech a lyofilizátech

Ve vzorcích koncentrátů a lyofilizátů byly identifikovány čtyři anthokyany a to kyanidin-3-glukosid, kyanidin-3-sambubiosid, kyanidin-3-sambubiosi-5-glukosid a v nízké koncentraci také kyanidin-3,5-diglukosid, který nebyl dále kvantifikován. Pořadí jejich retence je znázorněno na obrázku 15 a souhlasí s literaturou [63]. Z kalibrační rovnice pro kyanidin-3-glukosid byly vypočítány koncentrace jednotlivých pigmentů, standardy pro další dva anthokyany nebyly k dispozici. Nejvíce zastoupeným anthokyanem byl kyanidin-3-sambubiosid. V případě koncentráту z extraktu ethanol/voda byl druhým nejkoncentrovanějším kyanidin-3-glukosid a jako poslední kyanidin-3-sambubiosid-5-glukosid. U koncentrátů a lyofilizátů z vodného extraktu tomu bylo naopak. Plochy píků jednotlivých anthokyanů jsou znázorněny v grafu 9.

Pro určení celkové koncentrace anthokyanových barviv byly koncentrace jednotlivých pigmentů sečteny, výsledné koncentrace jsou uvedeny v tabulce 23 a znázorněny v grafu 10. Stejně jako při stanovení celkových anthokyanových barviv pH diferenciální metodou byl obsah anthokyanů v koncentrátech K1 a K2 vyšší než u koncentrátů K3 a K4.

Celková koncentrace anthokyanů zjištěná pomocí HPLC je u všech vzorků o něco vyšší než koncentrace anthokyanů zjištěná pomocí pH diferenciální metody. Lee a Finn (2007) stanovili pomocí HPLC dokonce 2,0–2,3krát vyšší koncentraci anthokyanů než při použití pH diferenciální metody [22].

5 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo navrhnout využití bezových výlisků v potravinářském průmyslu. Náplní práce byla příprava koncentráту extraktu z bezových výlisků, lyofilizace extraktu z bezových výlisků a definování charakteristických vlastností výsledných produktů.

Bezové výlisky byly vysušeny při 40 °C a byla u nich stanovena zbytková vlhkost před extrakcí na 9,6 %. Sušené výlisky byly extrahovány vodou o laboratorní teplotě, vodou o počáteční teplotě 95 °C a směsí ethanolu a vody v poměru 1:1 (V/V). Byl optimalizován poměr mezi navázkou výlisků a objemem extrakčního činidla. Při této optimalizaci byly zkoumány následující poměry výlisky/rozpouštědlo 1:2; 1:2,4; 1:3,6; 1:4; 1:5; 1:6 (m/v). Jako parametr kvality extraktu byl zvolen celkový obsah anthokyanových barviv stanovený pH diferenciální metodou. Nejlepším poměrem u všech zvolených extrakčních činidel se ukázal poměr 1:2,4. Nejvyšších výtěžků bylo dosaženo při extrakci směsí ethanol/voda. V případě extrakce vodou se nepotvrdilo, že by měla výchozí teplota pozitivně ovlivnit extrakci.

Při přípravě koncentráту byl zkoumán vliv teploty vodní lázně odparky na úroveň degradace anthokyanových barviv, které byly stanoveny pH diferenciální metodou ve výchozím extraktu a ve výsledném koncentrátu. Extrakty byly koncentrovány 20 minut při různých teplotách vodní lázně: 40 °C, 60 °C, 75 °C a 85 °C. Z výsledných hodnot obsahu anthokyanů byl vypočten rozdíl, který byl posouzen jako úbytek barviv vlivem jejich degradace. Bylo zjištěno, že degradace pigmentů klesá s klesající teplotou vodní lázně odparky. Při teplotě 85 °C byla zjištěna degradace $18,2 \pm 2,0$ % z původního množství barviv, při 45 °C $5,8 \pm 0,5$ %.

Finální produkt byl připraven zakoncentrováním 100 ml extraktu (extrakt ethanol/voda 1:1 a extrakt voda) na 18 ml. Koncentrování vodného extraktu bylo provedeno z ekonomických důvodů, voda je levnějším a dostupnějším extrakčním činidlem než ethanol. Nicméně výchozí vodný extrakt obsahuje méně barviv než ethanolový a k odpaření vody při nízké teplotě je nutné využít výkonnější vývěvy než v případě koncentrování ethanolového extraktu.

Další metodou pro zakoncentrování extraktu byla zvolena lyofilizace, tato metoda byla využita pro zakoncentrování vodného extraktu.

Výsledné produkty byly charakterizovány stanovením refraktometrické sušiny, pH, titrační kyselosti, celkových fenolických látek podle Folin-Ciocalteua, celkových anthokyanových barviv pH diferenciální metodou a stanovením majoritních anthokyanů kapalinovou chromatografií. Koncentrace chemických charakteristik byly stanovovány v 5,6krát zahuštěném koncentrátu a v 1 g lyofilizátu.

Rozpustná sušina v koncentrátech se pohybovala v rozmezí 18,9–21,7 hm. % sacharosy. V lyofilizátech byl obsah rozpustné sušiny 33,6 a 37,5 hm. % sacharosy.

Hodnoty pH u koncentrátů z extraktu ethanol/voda byly 4,05 a 4,12, celková titrační kyselost těchto koncentrátů byla $16,32$ a $16,20$ g·l⁻¹. pH koncentrátů z vodných extraktů bylo o něco vyšší 4,37 a 4,42, titrační kyselost byla nižší než u koncentrátu ethanol/voda a to 13,29 a 14,58 g·l⁻¹. Lyofilizáty měly pH 4,47 a 4,33, titrační kyselost byla 17,97 a 23,85 g·l⁻¹. Celková titrační kyselost byla vyjádřena jako ekvivalent kyseliny citronové.

Celkový obsah fenolických látek v koncentrátech z extraktu ethanol/voda byl 42,5 a 39,3 g·l⁻¹, v koncentrátech z vodných extraktů o něco nižší 31,2 a 34,6 g·l⁻¹. Lyofilizáty obsahovaly 58,7 a 64,6 g·l⁻¹ fenolických látek. Obsah fenolických látek je vyjádřen jako ekvivalent kyseliny gallové.

Celkový obsah anthokyanů stanovených pH diferenciální metodou byl v koncentrátu z extraktu ethanol/voda 1 521 a 1 610 mg·l⁻¹. V koncentrátech z vodných extraktů byl obsah anthokyanů nižší, a to 925 a 1 083 mg·l⁻¹. Obsah anthokyanů v lyofilizátech byl 2 209 a 1 959 mg·l⁻¹. Celkový obsah anthokyanů byl vypočítán jako ekvivalent kyanidinu-3-glukosidu. Nižší obsah anthokyanů oproti fenolickým látkám je způsoben tím, že jsou ve slupkách bezu černého výrazně obsaženy také jiné fenolické látky.

Pomocí HPLC byly na koloně Kinetex® EVO C18 Core-Shell separovány hlavní anthokyaniny, které jsou obsaženy v plodech bezu černého. Tyto pigmenty byly eluovány v pořadí kyanidin-3-sambubiosid-5-glukosid, kyanidin-3,5-diglukosid, kyanidin-3-sambubiosid, kyanidin-3-glukosid. Nejvíce zastoupeným pigmentem byl ve všech vzorcích kyanidin-3-sambubiosid. Celkový obsah anthokyanů stanovených pomocí HPLC byl v koncentrátu z extraktu ethanol/voda 2 497 a 2 754 mg·l⁻¹. V koncentrátech z vodných extraktů byl obsah anthokyanů nižší, a to 1 104 a 1 421 mg·l⁻¹. Obsah anthokyanů v lyofilizátech byl 2 460 a 2 068 mg·l⁻¹. Celkový obsah anthokyanů byl vypočítán jako ekvivalent kyanidinu-3-glukosidu.

Výsledky této práce by měly poukázat na možnost využití bezových výlisků po lisování šťávy k dalšímu zpracování v potravinářství. V dalších studiích by bylo možné se zaměřit na stabilizaci a vhodné uchovávání koncentrátů.

7 ZDROJE

- [1] Plants Database. United States Department of Agriculture [online]. Washington, DC: USDA, 2015 [cit. 2019-04-29]. Dostupné z: <http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=SANI4>
- [2] DOLEJŠÍ, Antonín, Vladimír KOTT a Lubomír ŠENK. Méně známé ovoce. Praha: Brázda, 1991. Zahrádka (Brázda). ISBN 80-209-0188-4.
- [3] KORBELÁŘ, Jaroslav a Zdeněk ENDRIS. Naše rostliny v lékařství. 7. vyd. Praha: Avicenum, 1990. ISBN 80-201-009-1.
- [4] HEMGESBERG, Hanspeter. Černý bez a naše zdraví: květy, listy a plody černého bezu léčí všechny potíže. Olomouc: Fontána, 2002. ISBN 80-861-7998-2.
- [5] Méně známé ovocné druhy. Introdukce a jejich potenciál pro zdravou výživu: Metodické listy OPVK. In: *VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.* [online]. Holovousy, 2019 [cit. 2019-05-02]. Dostupné z: http://www.vsuo.cz/13/Vysoke_skoly/
- [6] Abeceda zahrady a bydlení: Bez černý v zahradě: možnosti pěstování [online]. [cit. 2019-04-30]. Dostupné z: <https://abecedazahrady.dama.cz/clanek/bez-cerny-v-zahrade-moznosti-pestovani>
- [7] MATĚJČEK, Aleš. Metodika pěstování kulturních odrůd bezu černého. Holovousy: Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy, 2013. ISBN 978-80-87030-27-1.
- [8] BRYŁA, Anna, Grażyna LEWANDOWICZ a Wojciech JUZWA. Encapsulation of elderberry extract into phospholipid nanoparticles. *Journal of Food Engineering* [online]. 2015, 167, 189-195 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2015.07.025. ISSN 02608774. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877415003349>
- [9] KRÜGER, S., M. MIRGOS a G.E. MORLOCK. Effect-directed analysis of fresh and dried elderberry (*Sambucus nigra* L.) via hyphenated planar chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 2015, 1426, 209-219 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.11.021. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967315016325>
- [10] 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* [online]. 2009, 114(2), 511-515 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.09.080. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814608011710>
- [11] HELENO, Sandrina A., Anabela MARTINS, Maria João R.P. QUEIROZ a Isabel C.F.R. FERREIRA. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds. *Food Chemistry* [online]. 2015, 173, 501-513 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.10.057. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614016197>

- [12] ZADERNOWSKI, Ryszard, Marian NACZK a Jarosław NESTEROWICZ. Phenolic Acid Profiles in Some Small Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2005, 53(6), 2118-2124 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1021/jf040411p. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf040411p>
- [13] 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 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1002/jsfa.6432. ISSN 00225142. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.6432>
- [14] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. Vyd. 2. upr. Tábor: OSSIS, 2002. ISBN 80-866-5900-3.
- [15] 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 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1021/jf501950s. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf501950s>
- [16] Fytos: BEZ ČERNÝ HASCHBERG [online]. 2013 [cit. 2019-04-30]. Dostupné z: <http://www.fytos.cz/Haschberg>
- [17] MUDGE, Elizabeth, Wendy L. APPLEQUIST, Jamie FINLEY, Patience LISTER, Andrew K. TOWNESMITH, Karen M. WALKER a Paula N. BROWN. Variation of select flavonols and chlorogenic acid content of elderberry collected throughout the Eastern United States. *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. 2016, 47, 52-59 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1016/j.jfca.2015.12.003. ISSN 08891575. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889157515002549>
- [18] SIMONYI, Agnes, Zihong CHEN, Jinghua JIANG, et al. Inhibition of microglial activation by elderberry extracts and its phenolic components. *Life Sciences* [online]. 2015, 128, 30-38 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1016/j.lfs.2015.01.037. ISSN 00243205. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002432051500106X>
- [19] MŁYNARCZYK, Karolina, Dorota WALKOWIAK-TOMCZAK a Grzegorz P. ŁYSIAK. Bioactive properties of *Sambucus nigra* L. as a functional ingredient for food and pharmaceutical industry. *Journal of Functional Foods* [online]. 2018, 40, 377-390 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1016/j.jff.2017.11.025. ISSN 17564646. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464617306977>
- [20] ERCISLI, Sezai, Murat TOSUN a Mustafa AKBULUT. Physico-chemical characteristics of some wild grown European elderberry (*Sambucus nigra* L.) genotypes. *Pharmacognosy Magazine* [online]. 2009, 5(20) [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.4103/0973-1296.58153. ISSN 0973-1296. Dostupné z: <http://www.phcog.com/text.asp?2009/5/20/320/58153>

- [21] BRIDLE, P. a C.F. TIMBERLAKE. Anthocyanins as natural food colours—selected aspects. *Food Chemistry* [online]. 1997, 58(1-2), 103-109 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1016/S0308-8146(96)00222-1. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814696002221>
- [22] 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 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1002/jsfa.3029. ISSN 00225142. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.3029>
- [23] 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* [online]. 2015, 18, 941-958 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1016/j.jff.2014.07.012. ISSN 17564646. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464614002400>
- [24] CASTAÑEDA-OVANDO, Araceli, Ma. de Lourdes PACHECO-HERNÁNDEZ, Ma. Elena PÁEZ-HERNÁNDEZ, José A. RODRÍGUEZ a Carlos Andrés GALÁN-VIDAL. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* [online]. 2009, 113(4), 859-871 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.09.001. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814608010674>
- [25] KHOO, Hock Eng, Azrina AZLAN, Sou Teng TANG a See Meng LIM. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits [online]. 2017, 61(1) [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1080/16546628.2017.1361779. ISSN 1654-6628. Dostupné z: <http://foodandnutritionresearch.net/index.php/fnr/article/view/1257>
- [26] JU, Zhiy a Luke R. HOWARD. Subcritical Water and Sulfured Water Extraction of Anthocyanins and Other Phenolics from Dried Red Grape Skin. *Journal of Food Science* [online]. 2005, 70(4), S270-S276 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2005.tb07202.x. ISSN 00221147. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2005.tb07202.x>
- [27] DELGADO-VARGAS, F., A. R. JIMÉNEZ a O. PAREDES-LÓPEZ. Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2000, 40(3), 173-289 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1080/10408690091189257. ISSN 1040-8398. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408690091189257>
- [28] WROLSTAD, Ronald E., Robert W. DURST a Jungmin LEE. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products [online]. 2005, 16(9), 423-428 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1016/j.tifs.2005.03.019. ISSN 09242244. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224405001548>

- [29] DA COSTA, Cristina T, Derek HORTON a Sam A MARGOLIS. Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, liquid chromatography–mass spectrometry and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* [online]. 2000, 881(1-2), 403-410 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)00328-9. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967300003289>
- [30] Labicom: Agilent Technologies [online]. Olomouc: Matosoft, 2019 [cit. 2019-04-30]. Dostupné z: <https://www.labicom.cz/produkty/spotrebn-material/kapalinova-chromatogr-prislusenstvi/hplcuhplc-kolony-predkolony-filtry/agilent-technologies>
- [31] Pragolab: Lyofilizátory Martin CHrist [online]. In.: 2018 [cit. 2019-04-30]. Dostupné z: <https://www.pragolab.cz/priprava-vzorku/lyofilizatory/lyofilizatory-martin-christ>
- [32] SAENZLOPEZ, R, P FERNANDEZZURBANO a M TENA. Development and validation of a capillary zone electrophoresis method for the quantitative determination of anthocyanins in wine. *Journal of Chromatography A* [online]. 2003, 990(1-2), 247-258 [cit. 2019-04-30]. DOI: 10.1016/S0021-9673(02)02006-X. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196730202006X>
- [33] WATANABE, Toshiro, Akira YAMAMOTO, Shiro NAGAI a Shigeru TERABE. Analysis of Elderberry Pigments in Commercial Food Samples by Micellar Electrokinetic Chromatography. *Analytical Sciences* [online]. 1998, 14(4), 839-844 [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.2116/analsci.14.839. ISSN 0910-6340. Dostupné z: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/analsci/14.839?from=CrossRef>
- [34] Mitić, Milan & Kostic, Danijela & Dimitrijevic, Danica & Stojanović, Branka & Đ. PAUNOVIC, DUŠAN & S. KRSTIC, MILOŠ. (2015). Determination of monomeric anthocyanins in red wines based on their degradation with hydrogen peroxide in the presence of Cu(II). *Agro Food Industry Hi Tech*. 26. 57-60. Dostupné z: [http://www.teknoscienze.com/getpdf.php?filename=Contents/Riviste/PDF/AF2_2015_RGB.pdf&beginpage=59&endpage=62&filetitle=Determination%20of%20monomeric%20anthocyanins%20in%20red%20wines%20based%20on%20their%20degradation%20with%20hydrogen%20peroxide%20in%20the%20presence%20of%20Cu\(II\)](http://www.teknoscienze.com/getpdf.php?filename=Contents/Riviste/PDF/AF2_2015_RGB.pdf&beginpage=59&endpage=62&filetitle=Determination%20of%20monomeric%20anthocyanins%20in%20red%20wines%20based%20on%20their%20degradation%20with%20hydrogen%20peroxide%20in%20the%20presence%20of%20Cu(II))
- [35] SABANCI, Serdal, Mutlu CEVIK, Omer F COKGEZME, Hasan YILDIZ a Filiz ICIER. Quality characteristics of pomegranate juice concentrates produced by ohmic heating assisted vacuum evaporation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 2019, 99(5), 2589-2595 [cit. 2019-04-30]. DOI: 10.1002/jsfa.9474. ISSN 00225142. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.9474>
- [36] BEGEMAN, Charles R. Simple evaporator for heat sensitive compounds. *Journal of Chemical Education* [online]. 1963, 40(8) [cit. 2019-04-30]. DOI: 10.1021/ed040p427. ISSN 0021-9584. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed040p427>

- [37] NIREESHA, GR., L. DIVYA, C. SOWMYA, N. VENKATESHAN, M. NIRANJAN BABU a V. LAVAKUMAR. Lyophilization/Freeze Drying - An Review. *International Journal of Novel Trends in Pharmaceutical Sciences* [online]. **2013**(3), 87-98 [cit. 2019-05-02]. ISSN 2277–2782. Dostupné z: <http://www.ijntps.com/article/2013/3/4/87-98>
- [38] CIURZYŃSKA, Agnieszka a Andrzej LENART. Freeze-Drying - Application in Food Processing and Biotechnology - a Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* [online]. 2011, 61(3), 165-171 [cit. 2019-04-30]. DOI: 10.2478/v10222-011-0017-5. ISSN 1230-0322. Dostupné z: <http://www.journalssystem.com/pjfn/Freeze-Drying-Application-in-Food-Processing-and-Biotechnology-a-Review,98302,0,2.html>
- [39] CARLETON, Richard O. Rotating vacuum evaporator. *Journal of Chemical Education* [online]. 1962, 39(5) [cit. 2019-04-30]. DOI: 10.1021/ed039p256. ISSN 0021-9584. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed039p256>
- [40] STRATIL, P., B. KLEJDUS a V. KUBÁŇ. Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals. *Talanta*[online]. 2007, 71(4), 1741-1751 [cit. 2019-04-30]. DOI: 10.1016/j.talanta.2006.08.012. ISSN 00399140. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914006005741>
- [41] A AGBOR, Gabriel, Joe A VINSON a Patrick E. DONNELLY. Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay. *International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics* [online]. 2014, **2014**, 147-156 [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.19070/2326-3350-1400028. ISSN 23263350. Dostupné z: <https://scidoc.org/articlepdfs/IJFS/IJFS-2326-3350-03-801.pdf>
- [42] STRATIL, Pavel, Bořivoj KLEJDUS a Vlastimil KUBÁŇ. Determination of Total Content of Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Vegetables Evaluation of Spectrophotometric Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2006, 54(3), 607-616 [cit. 2019-04-30]. DOI: 10.1021/jf052334j. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf052334j>
- [43] SINGLETON, Vernon L., Rudolf ORTHOFER a Rosa M. LAMUELA-RAVENTÓS. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Oxidants and Antioxidants Part A* [online]. Elsevier, 1999, 1999, , 152-178 [cit. 2019-04-30]. *Methods in Enzymology*. DOI: 10.1016/S0076-6879(99)99017-1. ISBN 9780121822002. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687999990171>
- [44] STRATIL, P., V. KUBÁŇ a J. FOJTOVÁ. Comparison of the phenolic content and total antioxidant activity in wines as determined by spectrophotometric methods. *Czech Journal of Food Sciences* [online]. 2008, 26(No. 4), 242-253 [cit. 2019-04-30]. DOI: 10.17221/1119-CJFS. ISSN 12121800. Dostupné z:

<https://www.agriculturejournals.cz/web/cjfs.htm?volume=26&firstPage=242&type=publishedArticle>

- [45] *Vysokoúčinná kapalinová chromatografie* [online]. Praha: Autorský kolektiv ústavu 402 VŠCHT Praha [cit. 2019-05-04]. Dostupné z: http://fchi-oppa.vscht.cz/uploads/AK-skripta/Kap_1.pdf
- [46] *CHROMacademy* [online]. USA: LC-GC magazine and Crawford Scientific, 2019 [cit. 2019-05-04]. Dostupné z: <https://www.chromacademy.com/index.html>
- [47] GARCÍA-CAÑAVERAS, Juan C., M. Teresa DONATO, José V. CASTELL a Agustín LAHOZ. A Comprehensive Untargeted Metabonomic Analysis of Human Steatotic Liver Tissue by RP and HILIC Chromatography Coupled to Mass Spectrometry Reveals Important Metabolic Alterations. *Journal of Proteome Research* [online]. 2011, 10(10), 4825-4834 [cit. 2019-04-30]. DOI: 10.1021/pr200629p. ISSN 1535-3893. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/pr200629p>
- [48] CHURÁČEK, Jaroslav a Pavel JANDERA. *Separace látek: kapalinová vysokoúčinná kolonová chromatografie*. 2. vyd. Praha: SNTL, 1986, 140 s.
- [49] *Instrumentace pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii* [online]. Josef Cvačka, 2010 [cit. 2019-05-04]. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc2.pdf>
- [50] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-0.
- [51] DOUŠA, Michal. *Základy separačních metod se zaměřením na HPLC*. Brno: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, 2002. Učební texty pro pracovníky ÚKZÚZ. ISBN 80-865-4809-0.
- [52] MILATA, Viktor a Peter SEGLA. *Spektrálne metódy v chémii*. 1. vyd. Bratislava: Vydavateľstvo STU, 2004. Edícia vysokoškolských učebníc. ISBN 80-227-2049-6.
- [53] NĚMCOVÁ, Irena, Petr RYCHLOVSKÝ a Ludmila ČERMÁKOVÁ. *Spektrometrické analytické metody*. 2. vyd. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0776-X.
- [54] PRÍBELA, Alexander. *Analýza potravín*. Bratislava: Slovenská technická univerzita, 1991. ISBN 80-227-0374-5.
- [55] HÁLKOVÁ, Jana, Marie RUMÍŠKOVÁ a Jana RIEGLOVÁ. *Analýza potravín*. 2. vyd. Újezd u Brna: I. Straka, 2001. ISBN 80-864-9402-0.
- [56] KERN: Abbe refraktometry KERN ORT -1 [online]. [cit. 2019-04-30]. Dostupné z: <https://vahy-kern.cz/produkty/kern-optics/kern-abbe-refraktometry/abbe-refraktometry-kern-ort-1/>
- [57] 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 [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.03.083. ISSN 09608524. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852409006464>
- [58] BERGERON, Chantal, Stefan GAFNER, Edgar CLAUSEN a Danielle J. CARRIER. Comparison of the Chemical Composition of Extracts from *Scutellaria lateriflora* Using Accelerated Solvent Extraction and Supercritical Fluid Extraction versus Standard Hot Water or 70% Ethanol Extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2005, **53**(8), 3076-3080 [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1021/jf048408t. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf048408t>
- [59] LAPORNIK, Brigita, Mirko PROŠEK a Alenka GOLC WONDRA. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering* [online]. 2005, **71**(2), 214-222 [cit. 2019-05-01]. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2004.10.036. ISSN 02608774. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877404005345>
- [60] SZALÓKI-DORKÓ, Lilla, Mónika STÉGER-MÁTÉ a László ABRANKÓ. Effects of fruit juice concentrate production on individual anthocyanin species in elderberry. *International Journal of Food Science and Technology* [online]. 2016, **51**(3), 641-648 [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1111/ijfs.13031. ISSN 09505423. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/ijfs.13031>
- [61] J. BERMÚDEZ-SOTO, María a Francisco A. TOMÁS-BARBERÁN. Evaluation of commercial red fruit juice concentrates as ingredients for antioxidant functional juices. *European Food Research and Technology* [online]. 2004, **219**(2), 133-141 [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1007/s00217-004-0940-3. ISSN 1438-2377. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00217-004-0940-3>
- [62] LOŠKOVÁ, T. Extrakce anthokyanových barviv z bezinkových výlisků. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, β01Ř. XY s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.
- [63] 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* [online]. 2008, **226**(4), 843-855 [cit. 2019-05-07]. DOI: 10.1007/s00217-007-0605-0. ISSN 1438-2377. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00217-007-0605-0>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UV	ultrafialové záření
VIS	viditelné záření
CE	kapilární elektroforéza
FW	čerstvá váha
GAE	ekvivalent kyseliny gallové
CGE	ekvivalent kyanidin-3-glukosidu
MF	mobilní fáze
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
HPLC-MS	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí
PDA	detektor s diodovým polem
NP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na normálních fázích
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na obrácených fázích
IEC	iontově výměnná chromatografie
IP-HPLC	iontově výměnná vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
SEC	molekulová vylučovací chromatografie
DAD	detektor s diodovým polem
CAE	ekvivalent kyseliny citronové
C3S5G	kyanidin-sambubiosid-5-glukosid
C35dG	Kyanidin-3,5-diglukosid
C3S	Kyanidin-3-sambubiosid
C3G	Kyanidin-3-glukosid
C3R	Kyanidin-3-rutinosid

9 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Tabulka – stanovení anthokyanových barviv při optimalizaci extrakce	76
Příloha 2: Tabulka – stanovení anthokyanových barviv při optimalizaci zahušťování na vakuové odparce	77
Příloha 3: Tabulka – degradace anthokyanových barviv při přípravě výsledných koncentrátů	78
Příloha 4: Kalibrační křivka kyseliny gallové	79
Příloha 5: Tabulka – celkové fenolické látky a anthokyany ve výsledných koncentrátech a lyofilizátech	80
Příloha 6: Tabulka – stanovení pH a titrovatelných kyselin ve výsledných koncentrátech a lyofilizátech	81
Příloha 7: Tabulka – refraktometrická sušina ve výsledných koncentrátech a lyofilizátech	82
Příloha 8: Kalibrační křivka kyanidin-3-glukosidu.....	83
Příloha 9: Obrázek – chromatogramy koncentrátu a lyofilizátu při 520 nm.....	84

10 PŘÍLOHY

Příloha 1: Tabulka – stanovení anthokyanových barviv při optimalizaci extrakce

Tabulka 24: výsledné hodnoty absorbance a koncentrace CGE ve vzorcích extraktů

	studená voda			horká voda			ethanol		
	A	CGE (mg·l ⁻¹)	CGE (mg·100 g ⁻¹)	A	CGE (mg·l ⁻¹)	CGE (mg·100 g ⁻¹)	A	CGE (mg·l ⁻¹)	CGE (mg·100 g ⁻¹)
1:2	0,428	142,94	35,57 ± 2,10	0,417	139,27	35,35 ± 1,14	0,289	241,30	61,30 ± 1,50
	0,415	138,60		0,427	142,61		0,294	245,47	
	0,435	145,28		0,426	142,27		0,298	248,81	
1:2,4	0,407	169,91	44,74 ± 5,15	0,562	187,70	46,65 ± 0,73	0,305	254,66	65,26 ± 2,36
	0,446	186,19		0,555	185,36		0,319	266,35	
	0,433	180,77		0,559	186,69		0,314	262,17	
1:3,2	0,345	138,27	34,33 ± 1,46	0,476	158,97	39,13 ± 1,32	0,284	237,12	58,86 ± 0,66
	0,336	134,66		0,465	155,30		0,282	235,45	
	0,347	139,07		0,465	155,30		0,280	233,78	
1:4	0,332	138,60	33,19 ± 3,63	0,416	138,93	35,37 ± 1,41	0,216	180,35	44,32 ± 1,34
	0,318	132,76		0,429	143,28		0,208	173,67	
	0,304	126,91		0,426	142,27		0,213	177,84	
1:5	0,243	101,45	26,09 ± 1,58	0,375	125,24	31,67 ± 1,22	0,167	139,44	36,32 ± 2,02
	0,253	105,62		0,377	125,91		0,178	148,62	
	0,254	106,04		0,386	128,92		0,177	147,79	
1:6	0,273	91,18	22,79 ± 0,21	0,484	88,90	22,64 ± 1,23	0,130	108,54	26,58 ± 1,01
	0,274	91,51		0,505	92,76		0,128	106,87	
	0,272	90,84		0,490	90,01		0,124	103,53	

Příloha 2: Tabulka – stanovení anthokyanových barviv při optimalizaci zahušťování na vakuové odparce

Tabulka 25: výsledné hodnoty absorbance a koncentrace CGE pro extrakt a pro z něj připravené koncentráty za různé teploty vodní lázně vakuové odparky

	A	CGE (mg·l ⁻¹)	CGE (mg·100 g ⁻¹)
extrakt	0,347	289,73	72,78 ± 0,79
	0,350	292,23	
	0,349	291,40	
40 °C	0,274	457,55	68,55 ± 0,36
	0,274	457,55	
	0,273	455,88	
60 °C	0,229	382,40	62,41 ± 0,67
	0,230	384,07	
	0,231	385,74	
75 °C	0,309	516,00	61,85 ± 0,29
	0,308	514,33	
	0,309	516,00	
85 °C	0,266	444,19	59,52 ± 1,45
	0,271	452,54	
	0,270	450,87	

Příloha 3: Tabulka – degradace anthokyanových barviv při přípravě výsledných koncentrátů

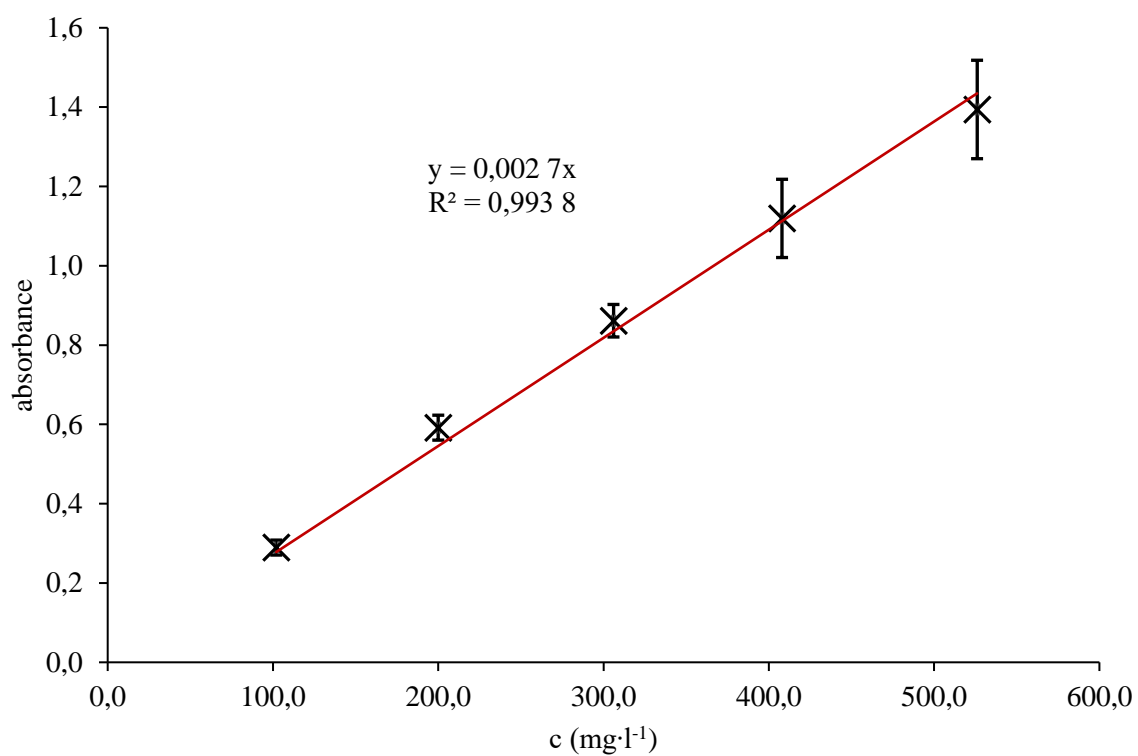
Tabulka 26: výsledné hodnoty absorbance a koncentrace CGE pro výsledné extrakty a koncentráty z nich připravené

ethanol/voda				voda			
	A	CGE (mg·l ⁻¹)	CGE (mg·100 g ⁻¹)		A	CGE (mg·l ⁻¹)	CGE (mg·100 g ⁻¹)
E1	0,347	289,73	75,01 ± 4,16	E3	0,511	204,80	50,03 ± 2,54
	0,35	292,23			0,492	197,18	
	0,349	291,40			0,495	198,38	
K1	0,513	1 713,31	72,49 ± 2,06	K3	0,401	1 339,25	47,43 ± 0,86
	0,521	1 740,02			0,396	1 322,55	
	0,523	1 746,70			0,396	1 322,55	
E2	0,351	293,07	72,78 ± 0,79	E4	0,238	198,72	50,58 ± 2,66
	0,367	306,42			0,248	207,07	
	0,36	300,58			0,241	201,22	
K2	0,477	1 593,07	69,33 ± 1,76	K4	0,326	1 088,77	48,89 ± 0,22
	0,482	1 609,77			0,325	1 085,43	
	0,488	1 629,81			0,325	1 085,43	

Příloha 4: Kalibrační křivka kyseliny gallové

Tabulka 27: Průměrné hodnoty absorbance ze tří měření pro sestavení kalibrační křivky kyseliny gallové

GAE (mg·ml ⁻¹)	A
102	0,298 ± 0,019
200	0,592 ± 0,031
306	0,861 ± 0,041
408	1,119 ± 0,099
526	1,394 ± 0,124



Graf 11: Kalibrační křivka kyseliny gallové

Příloha 5: Tabulka – celkové fenolické látky a anthokyany ve výsledných koncentrátech a lyofilizátech

Tabulka 28: výsledné hodnoty absorbance a koncentrace celkových fenolických látek a anthokyanů ve výsledných koncentrátech a lyofilizátech

	fenolické látky			anthokyany		
	A	GAE (mg·l ⁻¹)	průměrná koncentrace GAE (mg·l ⁻¹)	A	CGE (mg·l ⁻¹)	průměrná koncentrace CGE (mg·100 g ⁻¹)
K1	0,649	42 732,51	42 513,0 ± 574,4	0,493	1 463,6	1 521,0 ± 123,7
	0,646	42 535,0		0,521	1 546,7	
	0,642	42 271,6		0,523	1 552,6	
K2	0,529	39 185,19	39 284,0 ± 281,1	0,477	1 593,1	1 610,9 ± 45,7
	0,532	39 407,41		0,482	1 609,8	
	0,53	39 259,26		0,488	1 629,8	
K3	0,533	31 334,51	31 197,3 ± 720,4	0,324	858,8	925,1 ± 147,1
	0,525	30 864,2		0,367	972,8	
	0,534	31 393,3		0,356	943,6	
K4	0,467	34 592,59	34 642,0 ± 926,2	0,316	1 055,4	1 083,2 ± 60,0
	0,463	34 296,3		0,328	1 095,4	
	0,473	35 037,0		0,329	1 098,8	
L1	0,404	59 851,85	58 666,7 ± 2 944,2	0,080	2 137,5	2 208,7 ± 202,8
	0,388	57 481,48		0,082	2 190,9	
	0,396	58 666,67		0,086	2 297,8	
L2	0,431	63 851,85	64 592,9 ± 3 187,2	0,141	1 883,6	1 959,3 ± 170,3
	0,446	66 074,07		0,151	2 017,2	
	0,431	63 851,85		0,148	1 977,1	

Příloha 6: Tabulka – stanovení pH a titrovatelných kyselin ve výsledných koncentrátech a lyofilizátech

Tabulka 29: koncentrace odměrného roztoku hydroxidu sodného

koncentrace NaOH (mol·l ⁻¹)	0,253
---	-------

Tabulka 30: výsledné hodnoty pH, spotřeba hydroxidu sodného při stanovení titrovatelných kyselin a výsledné hodnoty koncentrace CAE ve výsledných koncentrátech a lyofilizátech

	pH		Titrovatelné kyseliny			
	pH	průměr pH	V _{NaOH} (ml)	c H ⁺ (mmol·l ⁻¹)	CAE (g·l ⁻¹)	průměrná koncentrace CAE (g·l ⁻¹)
K1	4,04	4,05 ± 0,05	1,1	0,278	15,84	16,32 ± 2,07
	4,07		1,2	0,304	17,28	
	4,03		1,1	0,278	15,84	
K2	4,12	4,12 ± 0,01	0,9	0,228	14,58	16,20 ± 4,03
	4,12		1,1	0,278	17,82	
	4,11		1,0	0,253	16,20	
K3	4,37	4,37 ± 0,01	1,0	0,253	12,86	13,29 ± 1,84
	4,36		1,1	0,278	14,15	
	4,37		1,0	0,253	12,86	
K4	4,43	4,42 ± 0,04	0,9	0,228	14,58	14,58 ± 0,00
	4,40		0,9	0,228	14,58	
	4,42		0,9	0,228	14,58	
L1	4,06	4,47 ± 0,03	3,4	0,034	17,63	17,97 ± 0,74
	4,08		3,5	0,035	18,15	
	4,08		3,5	0,035	18,15	
L2	4,03	4,33 ± 0,01	4,6	0,047	23,85	23,85 ± 0,00
	4,04		4,6	0,047	23,85	
	4,03		4,6	0,047	23,85	

Příloha 7: Tabulka – refraktometrická sušina ve výsledných koncentrátech a lyofilizátech

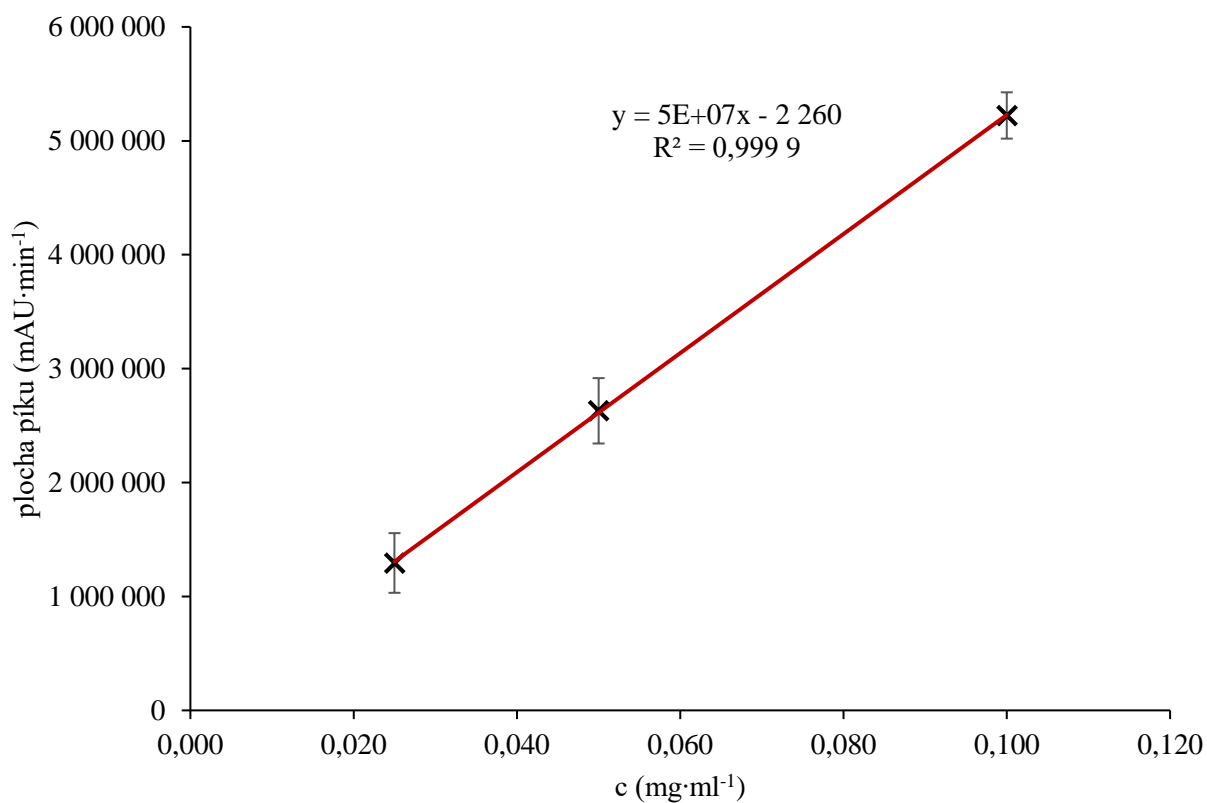
Tabulka 31: index lomu a příslušné hmotnostní % sacharózy ve výsledných koncentrátech a lyofilizátech

	Index lomu	hm. % sacharózy	průměrné hm. % sacharózy
K1	1,334 3	18,6	19,9 ± 3,2
	1,334 5	21,2	
	1,334 4	20,0	
K2	1,338 5	19,0	18,9 ± 0,5
	1,338 4	18,7	
	1,338 5	19,0	
K3	1,334 6	22,6	21,7 ± 2,0
	1,334 5	21,2	
	1,334 5	21,2	
K4	1,338 9	20,4	20,7 ± 0,8
	1,339 0	20,7	
	1,339 1	21,0	
L1	1,340 0	38,4	37,5 ± 3,8
	1,340 0	38,4	
	1,339 5	35,8	
L2	1,333 3	33,6	33,6 ± 0,0
	1,333 3	33,6	
	1,333 3	33,6	

Příloha 8: Kalibrační křivka kyanidin-3-glukosidu

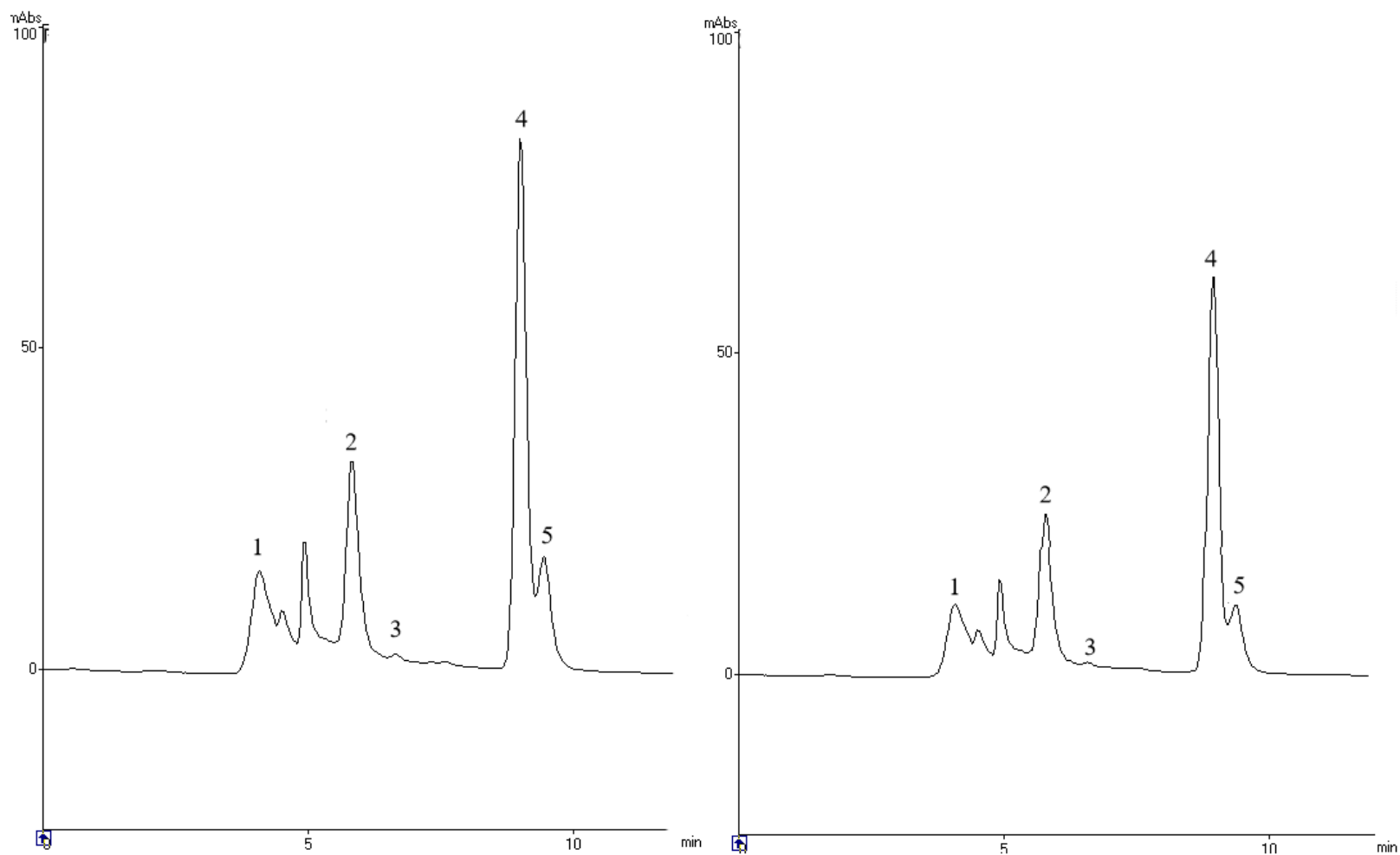
Tabulka 32: Průměrné hodnoty plochy píků ze tří měření pro sestavení kalibrační křivky kyanidin-3-glukosidu

c (mg·ml ⁻¹)	plocha píku
0,1	5 222 461 ± 203 233
0,05	2 629 885 ± 286 950
0,025	1 294 028 ± 262 040



Graf 12: kalibrační křivka kyanidin-3-glukosidu

Příloha 9: Obrázek – chromatogramy koncentráту a lyofilizátu při 520 nm



Obrázek 16: HPLC chromatogram koncentráту K3 a lyofilizátu L1 při 520 nm (1: mrtvý objem; 2: kyanidin-3-sambubiosid-5-glukosid; 3: kyanidin-3,5-diglukosid; 4: kyanidin-3-sambubiosid; 5: kyanidin-3-glukosid)