



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

BIOLOGICKY AKTIVNÍ LÁTKY ARONIE (ARONIA SPP.)

BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES OF CHOKEBERRY (ARONIA SPP.)

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Kateřina Palkovská

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.

BRNO 2021

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1562/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Kateřina Palkovská**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Biologicky aktivní látky aronie (*Aronia* spp.)

Zadání diplomové práce:

- Zpracujte literární přehled dané problematiky:
 - charakteristika, složení a vlastnosti aronie (*Aronia* spp.)
 - účinné látky aronie s antimikrobiálním a antioxidačním potenciálem, jejich diverzita s ohledem na různé části rostliny
 - možnosti využití aronie s důrazem na potravinářské aplikace
 - těkavé (aromatické) látky aronie
 - možnosti získávání extraktů účinných látek z přírodních materiálů (přehled extrakčních metod)
 - možnosti stanovení těkavých látek v extraktech z přírodních materiálů – princip, provedení, přehled aplikací především na aronii
 - možnosti měření antioxidační aktivity extraktů z přírodních materiálů – princip, provedení, přehled aplikací především na aronii
 - možnosti stanovení antimikrobiální aktivity extraktů z přírodních materiálů – princip, provedení, přehled aplikací především na aronii
- Vyzkoušejte různé systémy získávání extraktů aronie se zaměřením na max. zisk bioaktivních sloučenin.
- Získané extrakty charakterizujte z hlediska obsahu těkavých látek, antioxidační a antimikrobiální aktivity.
- Diskutujte senzorickou a nutriční hodnotu vyrobeného extraktu, výhody/nevýhody zvoleného optimálního postupu a příp. možné využití v praxi.

Termín odevzdání diplomové práce: 30.7.2021:

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

Bc. Kateřina Palkovská
student(ka)

doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá přípravou extraktů z plodů aronie, optimalizací podmínek pro extrakci a následnou charakteristikou získaného optimálního extraktu.

V teoretické části jsou uvedeny informace o botanické charakteristice druhu *Aronia melanocarpa* a o jejím využití. Dále je popsáno chemické složení plodů aronie a popsány hlavní biologicky aktivní látky, které rostlina obsahuje. V závěru teoretické části jsou popsány extrakční a separační techniky, metody stanovení antioxidační, antimikrobiální aktivity a aromaticky aktivních látek.

Experimentální část popisuje optimalizaci macerace tak, aby macerát obsahoval co největší množství polyfenolických látek a zároveň i aromaticky aktivních látek. Jako optimální se ukázal pro maceraci plodů aronie 40% etanol, při teplotě 60 °C, s poměrem navážky a rozpouštědla 1:5, po dobu 40 minut. U optimálního extraktu byl stanoven celkový obsah polyfenolů na $5237,2 \pm 40,7 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{kg}^{-1}$ a antioxidační aktivita metodou TEAC na $512,5 \pm 5,04 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. V extraktu bylo identifikováno 24 aromaticky aktivních látek, přičemž největší procentuální množství bylo monoterpenů a aldehydů. Dále bylo zjištěno, že extrakt nevykazoval antimikrobiální aktivitu vůči použitým mikroorganismům (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli* a *Candida glabrata*).

Získané výsledky potvrzují, že extrakty z aronie jsou významným zdrojem řady biologicky aktivních sloučenin a mohou být používány do potravin jako přírodní zdroj nutričně i sensoricky cenných látek.

ABSTRACT

This master thesis deals with preparation of extracts from fruits of aronia, optimization of conditions for extraction and subsequent characteristics of the obtained optimal extract.

In the theoretical part information about the botanical characteristics of *Aronia melanocarpa* and about its utilization are mentioned. Furthermore, the chemical composition of aronia fruits is described and the main biologically active substances contained in the plant are described. At the end of the theoretical part extraction and separation techniques, determination methods of antioxidant, antimicrobial activity and determination of aromatic active compounds are described.

The experimental part describes the optimization of maceration so that the macerate contains as much polyphenolic substances as possible, as well as aromatic active substances. 40% ethanol, at a temperature of 60 °C, with a weight solvent ratio of 1: 5, for 40 minutes proved to be optimal for the maceration of aronia fruits. The total polyphenol content of the optimal extract was determined to be $5237.2 \pm 40.7 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{kg}^{-1}$ and the antioxidant activity by TEAC to be $512.5 \pm 5.04 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. 24 aromatic active compounds were identified in the extract, with the largest percentage being monoterpenes and aldehydes. Furthermore, it was found that the extract did not show antimicrobial activity against the microorganisms used (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli* and *Candida glabrata*).

The obtained results confirm that aronia extracts are an important source of many biologically active compounds and can be used in food as a natural source of nutritionally and sensory valuable substances.

KLÍČOVÁ SLOVA

Aronie, aromatické látky, antioxidanty, antimikrobiální aktivita, SPME, GC-MS

KEYWORDS

Chokeberry, aroma compounds, antioxidants, antimicrobial activity, SPME, GC-MS

PALKOVSKÁ, Kateřina. *Biologicky aktivní látky aronie (Aronia spp.)*. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131333>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Eva Vítová.

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 studentky

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce doc. Ing. Evě Vítové, Ph.D., za veškerý poskytnutý čas a odborné vedení při řešení této práce. Dále bych ráda poděkovala svým rodičům a manželovi, za pomoc a podporu během celého studia.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Aronie	9
2.1.1	Botanická charakteristika (<i>Aronia melanocarpa</i>)	9
2.2	Chemické složení aronie.....	10
2.2.1	Biologicky aktivní látky aronie	11
2.2.1.1	Polyfenolové sloučeniny	11
2.2.1.2	Karotenoidy.....	14
2.2.2	Aromaticky aktivní látky aronie.....	14
2.3	Využití aronie	15
2.4	Extrakční a separační techniky	16
2.4.1	Konvenční extrakční techniky.....	16
2.4.1.1	Macerace	16
2.4.1.2	Digesce.....	16
2.4.1.3	Soxhletova extrakce	16
2.4.1.4	Destilační extrakce.....	17
2.4.2	Nekonvenční extrakční techniky	17
2.4.2.1	Superkritická fluidní extrakce	17
2.4.2.2	Ultrazvuková extrakce	18
2.4.2.3	Mikrovláknová extrakce	18
2.4.2.4	Enzymová extrakce	18
2.5	Antioxidační aktivita	18
2.5.1	Metody stanovení antioxidační aktivity	19
2.5.1.1	Stanovení celkových polyfenolů.....	19
2.5.1.2	DPPH test.....	20
2.5.1.3	Metoda TEAC	20
2.5.1.4	Metoda ORAC	21
2.5.1.5	Metoda FRAP	21
2.6	Metody stanovení antimikrobiální aktivity.....	21
2.6.1	Difúzní metody.....	22
2.6.2	Diluční metody	22
2.7	Metody stanovení aromaticky aktivních látek.....	22
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	25
3.1	Použité přístroje	25
3.2	Použité chemikálie.....	25

3.3	Analyzované vzorky	25
3.4	Přípravy, postupy a analýzy.....	26
3.4.1	Optimalizace přípravy extraktu.....	26
3.4.2	Spektrofotometrické stanovení celkových polyfenolů.....	26
3.4.2.1	Sestrojení kalibrační řady pro stanovení celkových polyfenolů.....	26
3.4.3	Stanovení aromatických látek	27
3.4.4	Stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS•+ radikálu.....	28
3.4.4.1	Sestrojení kalibrační řady pro stanovení celkové antioxidační aktivity	28
3.4.5	Stanovení antimikrobiální aktivity.....	29
3.5	Statistické zpracování výsledků.....	30
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	31
4.1	Optimalizace macerace.....	31
4.1.1	Optimalizace doby macerace.....	31
4.1.2	Optimalizace koncentrace rozpouštědla.....	34
4.1.3	Optimalizace poměru navážky k rozpouštědлу	36
4.1.4	Optimalizace teploty macerace	39
4.2	Charakterizace optimalizovaného extraktu.....	41
4.2.1	Celkový obsah polyfenolů v optimalizovaném extraktu.....	41
4.2.2	Aromaticky aktivní látky v optimalizovaném extraktu.....	42
4.2.3	Antioxidační aktivita optimalizovaného extraktu	44
4.2.4	Antimikrobiální aktivita optimalizovaného extraktu	45
5	ZÁVĚR	46
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	47
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	53
8	PŘÍLOHA	54
8.1	Chromatogram optimalizovaného extraktu	54

1 ÚVOD

Aronie (*Aronia melanocarpa*), českým názvem temnoplodec černoplodý, je keř, jehož plodem jsou temně fialové bobule trpké chuti. Plody obsahují řadu prospěšných látek, zejména antioxidantů, vitamínu C, dále vitamíny skupiny B a celou řadu minerálních látek. Mezi látky obsažené v aronii a zároveň vykazující vysokou antioxidační aktivitu se řadí polyfenolické látky, mezi něž se řadí například flavonoidy, polyfenolové kyseliny a antokyany, které způsobují charakteristické zbarvení bobulí. V současnosti je aronie méně známá, ale s nastupujícím trendem zdravé výživy se s ní častěji setkáváme. Nejčastěji se využívá v potravinářském průmyslu k výrobě marmelád, kompotů, šťáv, sirupů, likérů a čaje. Využití nalézá aronie i ve farmaceutickém průmyslu, kde už v minulosti byla využívána v bylinném lékařství jako lék proti vysokému krevnímu tlaku.

Tato diplomová práce se zabývá optimalizací macerace s maximálním výtěžkem polyfenolických, a zároveň aromaticky aktivních látek ze sušených plodů aronie. Za tímto účelem jsou porovnávány 4 faktory ovlivňující maceraci, a to: doba macerace, koncentrace etanolu, teplota a poměr navážky a rozpouštědla. Optimalizovaný extrakt byl poté charakterizován z hlediska celkového obsahu polyfenolů, aromaticky aktivních látek, antioxidační aktivity a antimikrobiální aktivity s cílem posoudit jeho potenciál pro případné využití v praxi.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Aronie

Aronie, jinak nazývaná jako temnoplodec černoplodý, lidově černý jeřáb (jeřabina), je keř, jehož plody jsou využívány v potravinářství, medicíně i v kosmetickém průmyslu. Zároveň se tento keř pěstuje i jako okrasná rostlina v zahradách, je nenáročná na pěstování a lze pěstovat i ve vyšších polohách. Tento keř spolehlivě plodí i více než dvacet let [1], [2].

Aronie pochází původně z východní části Severní Ameriky, kde byla domorodým kmenem Potawatomi používána k výrobě čaje na nachlazení. Na počátku dvacátého století se rostlina dostala do jihovýchodní a střední Evropy, kde se používala k výrobě marmelád, džusů, vín a byla využívána zejména jako zdroj bohatý na přírodní potravinová barviva. Aronie byla také využívána v bylinném lékařství, zejména v Rusku, jako lék proti vysokému krevnímu tlaku, žaludečním vředům nebo jako antiaterosklerotikum [1], [4], [5].



Obrázek 1: *Aronia melanocarpa* [3]

2.1.1 Botanická charakteristika (*Aronia melanocarpa*)

Aronie je opadavý keř vysoký 90-180 cm s temně fialovými malvicemi (viz. Obrázek 1), které mají průměr 6-13 mm, rostou ve shlucích a dozrávají koncem srpna až začátkem září. Od května do června aronie kvete čistě bílými květy, které jsou uspořádány v chocholících. Listy má 3-7 cm dlouhé, jednoduché, celokrajné, lesklé, sytě zelené, na spodní straně holé. Koncem léta se listy zbarvují do odstínů zelené, žluté, růžové, hnědočervené až karmínově červené barvy [1], [5].

Keř aronie není náročný na pěstování, nemá vysoké nároky na půdu, ale nevhodné jsou zamokřené půdy v zastíněném prostředí. Vysoké úrody s velkými plody lze dosáhnout v humózních půdách s dobrou zásobou živin. Aronie je velmi přizpůsobivá prostředí, ale je zapotřebí dbát na dostatečné množství světla, je odolná i vůči nízkým teplotám, snese až -35 °C [1], [2], [5].

Taxonomické zařazení druhu aronie je uvedeno v *Tabulce 1*. Rod aronie zahrnuje tři druhy keřů, a to *Aronia melanocarpa* (temnoplodec černoplodý), *Aronia arbutifolia* (temnoplodec

planikolistý) a *Aronia prunifolia* (temnoplodec třešňolistý), která je křížencem druhů *A. melanocarpa* x *A. arbutifolia* [2].

Tabulka 1: Taxonomické zařazení aronie [6]

Říše	Rostliny (<i>Plantae</i>)
Podříše	Cévnaté rostliny (<i>Tracheobionta</i>)
Nadoddělení	Semenné rostliny (<i>Spermatophyta</i>)
Oddělení	Krytosemenné (<i>Magnoliophyta</i>)
Třída	Nižší dvouděložné (<i>Magnoliopsida</i>)
Podtřída	Rosidy (<i>Rosidae</i>)
Řád	Růžotvaré (<i>Rosales</i>)
Čeleď	Růžovité (<i>Rosaceae</i>)
Rod	Temnoplodec (<i>Aronia</i>)
Druh	Černoplodý (<i>Aronia melanocarpa</i>)

2.2 Chemické složení aronie

Na chemické složení má vliv mnoho faktorů, například vliv použitého kultivaru, doby sklizně, závisí ale také na kvalitě půdy nebo na klimatických podmínkách. Složení bobulí je charakteristické především vysokým obsahem sorbitolu a polyfenolových sloučenin, celkový obsah polyfenolů v aronii byl v publikaci Kulling a Rawel [7] v rozmezí 3,44 g – 7,85 g na 100 g sušiny.

Polyfenolové sloučeniny, zejména anthokyany a prokyanidiny, tvoří hlavní skupinu biologicky aktivních látek v plodech, které přispívají k antioxidační aktivitě rostliny, díky vysokému obsahu těchto sloučenin, je aronie považována za jeden z nejsilnějších antioxidantů ve stravě [2], [7], [8].

Aronie je zdrojem cukrů, celkový obsah redukujících cukrů byl stanoven v publikaci Sidor a Gramza-Michałowska [8] na 5,71-19,36 g/100 g, zahrnující fruktózu stanovenou na 1,38-4,71 g/100 g a glukózu stanovenou na 1,09-5,70 g/100 g. Obsah sacharózy v této publikaci se pohyboval od 0 do 1,53 g/100 g ovoce, oproti tomu v publikaci Kulling a Rawel [7] sacharóza nebyla detekovaná. Dále je aronie zdrojem cukerného alkoholu sorbitolu a parasorbosidu. Obsah sorbitolu podle publikace Sidor a Gramza-Michałowska [8] byl stanoven v rozmezí 4,36-8,56 g/100 g ovoce, v publikaci Kulling a Rawel [7] byl obsah sorbitolu stanoven enzymaticky na 80 g·l⁻¹. Oproti jiným testovaným bobulovitým plodům jsou tyto hodnoty nejvyšší, takže je možné použít obsah sorbitolu v aronii jako biomarker ve směsích šťáv s aronií. Sorbitol je náhražka cukru často používaná v dietních potravinách a působí jako slabé nestimulační projímadlo [7].

Množství bílkovin obsažených v aronii bylo podle publikace Sidor a Gramza-Michałowska [8] stanoven na 3,7 g/100 g sušených bobulí a v čerstvých bobulích na 0,60-0,81g/100 g, oproti tomuto v publikaci Kulling a Rawel [7] bylo přítomné množství bílkovin v čerstvém ovoci do 0,7 g/100 g, takže tyto hodnoty se od sebe neliší. V aronii byly stanoveny některé aminokyseliny, jako například arginin, tyrosin, histidin, lysin, cystein, α -alanin, asparagin, serin, kyselina glutamová a threonin. Většina aminokyselin, včetně esenciálních, byla nalezena ve výliscích. V čerstvě lisované šťávě byla stanovena jako hlavní obsažená aminokyselina asparagin [7], [8], [10].

Celkový obsah tuku v čerstvých bobulích aronie byl podle publikace Kulling a Rawel [7] stanoven na 0,14 g/100 g, v publikaci Sidor a Gramza-Michałowska [8] na 0,09-0,17 g/100 g, což jsou malá množství. Obsah lipidů ve výliscích aronie byl v publikaci Sidor a Gramza-Michałowska [8] stanoven na 5,5 g / 100 g, z toho 65 % byly polynenasycené mastné kyseliny (PUFA), výlisky obsahovaly hlavně kyselinu linolovou a olejovou. Hlavním zdrojem lipidů v aronii jsou zejména semena, semena podle publikace Kulling a Rawel [7] obsahovala 19,3 g/kg glyceridového oleje s kyselinou linolovou jako hlavní mastnou kyselinou. V olej ze semen aronie jsou především obsaženy fosfolipidy, zastoupené především fosfatidylcholinem, fosfatidylinositolem a fosfatidylethanolaminem. Další hlavní složkou jsou steroly, kde hlavními zástupci v aronii jsou β -sitosterol, kampesterol a stigmasterol [7], [8], [10].

Plody a produkty z aronie jsou potenciálně bohatými zdroji draslíku, vápníku, fosforu, hořčíku, sodíku, železa a zinku. V publikaci Šnebergová a kol. [12] byl stanoven průměrný obsah draslíku na 2,90 g/kg, vápníku na 0,27 g/kg, fosforu na 0,34 g/kg a hořčíku na 0,16 g/kg. Vysoká hladina makroprvků, mezi něž jsou řazeny vápník, fosfor, hořčík, draslík, sodík, chlor a síra, poukazuje na to, že extrakt z aronie by se dal využít jako potenciální přirozený výživový doplněk stravy, protože dokáže kompenzovat denní nutriční požadavky. Množství a složení minerálních látek v aronii se může lišit, závisí na geografickém původu rostliny, odrůdě, na složení půdy a na míře znečištění životního prostředí. Koncentrace minerálních látek se také mění – roste – od počáteční vegetační fáze až po fázi, kdy je plod úplně zralý [7], [8], [11], [12].

2.2.1 Biologicky aktivní látky aronie

Biologicky aktivní látky jsou látky, které se přirozeně vyskytují v rostlinách jako sekundární metabolity, přičemž jejich přítomnost není nezbytně nutná k přežití organismu, jsou to spíše specializované sloučeniny, které rostlině poskytují například mezidruhové konkurenční výhody, obranyschopnost a přitažlivost. Biologicky aktivní látky zahrnují širokou škálu chemických struktur a funkcí, hrají klíčovou roli v životě zvířat s velkým potenciálem pro lidské blaho, většinou s farmakologickými nebo toxikologickými účinky, proti mikrobiálním patogenům a chorobám, včetně rakoviny u lidí a zvířat [13], [14].

Mezi hlavní zástupce biologicky aktivních látek patří polyfenolové sloučeniny, alkaloidy a terpenoidy. Mezi další zástupce patří polyacetyleny, polyeny, různé pigmenty, kyanogenní glukosidy, glukosinoláty a neproteinové aminokyseliny. Většina dietních bioaktivních látek souvisejících s prevencí nemocí jsou buď fenolické nebo terpenoidní látky [14].

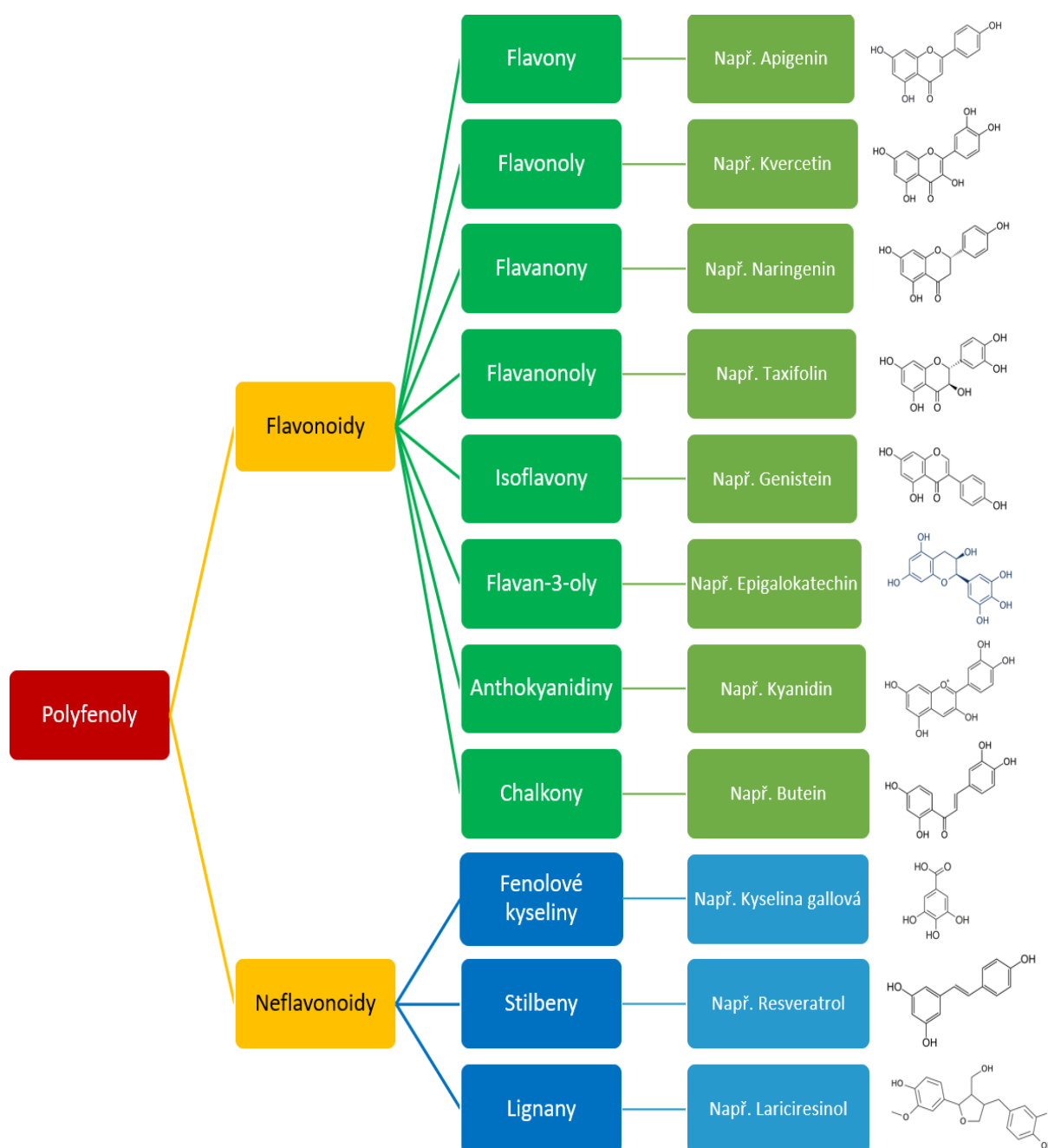
Mezi nejpoužívanější metody, jak tyto sloučeniny extrahovat z rostlin, patří konvenční extrakce kapalina-kapalina nebo pevná látka-kapalina, a pokročilé metody zahrnující vysokotlakou kapalnou extrakci, subkritickou a superkritickou extrakci a extrakci pomocí mikrovln a ultrazvuku. Extrahované sloučeniny se dále charakterizují pomocí hmotnostní spektrometrie s detektorem doby letu, a s laserovou desorpční/ionizační za účasti matrice (MALDI-TOF-MS), na základě jejich specifických absorpčních spekter, které se použijí pro formulaci různých léčiv [13].

2.2.1.1 Polyfenolové sloučeniny

Polyfenolové sloučeniny jsou biologicky aktivní organické sloučeniny s intenzivním metabolismem. Obsahují více než jeden aromatický kruh, kde za nejdůležitější strukturní charakteristiku pro biologickou aktivitu jsou považovány vždy přítomné hydroxylové skupiny. Několik hydroxylových skupin zvyšuje molekulární stabilitu, což umožňuje účinnější antioxidační aktivitu prostřednictvím zachycování a chelatace volných radikálů. Přírodní polyfenoly nejen, že vykazují antioxidační vlastnosti, ale také se objevují jako sloučeniny nesoucí antimikrobiální, antivirové, antibakteriální, protizánětlivé a také antikarcinogenní

indukující sloučeniny. Polyfenoly mohou také působit nepřímo modulací genové exprese a signalizačními dráhami ovlivňujícími činnost buněčných antioxidantních enzymů [15], [16], [18].

Schéma klasifikace polyfenolových sloučenin je uvedeno na *Obrázku 2*, polyfenoly mohou být obecně klasifikovány jako flavonoidy a neflavonoidy. Mezi flavonoidy jsou zařazeny flavony, flavonoly, flavanony, flavanonoly, isoflavony, flavan-3-oly (katechiny), flavan-3,4-dioly (leukoanthokyanidiny), anthokyanidiny a chalkony. Mezi neflavonoidy se řadí fenolové kyseliny, stilbeny a lignany [15], [16], [18].



Obrázek 2: Klasifikace polyfenolových sloučenin; upraveno podle [18]

Potenciální zdravotní účinky polyfenolů jsou předmětem rozsáhlých výzkumů kvůli jejich příznivým účinkům v boji proti chorobám způsobeným oxidačním stresem, včetně

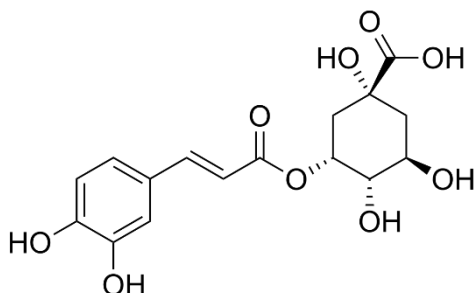
kardiovaskulárních onemocnění, rakoviny, cukrovky a neurodegenerativních onemocnění [15], [16].

Celkový obsah polyfenolových sloučenin v plodech aronie se v různých publikacích liší, jak již bylo popsáno výše, pravděpodobně byly použity různé kultivary nebo z důvodu jiných klimatických podmínek, například v publikaci Šnebergová a kol. [12] byl stanoven spektrofotometricky, pomocí Folin-Ciocalteuového činidla, celkový obsah polyfenolů v rozmezí 6872–8223 mg_{GAE}·kg⁻¹, ale například v publikaci Jakobek a spol. [19] byl stejnou metodou stanoven obsah polyfenolů v různých kultivarech v rozmezí 9012-12055 mg_{GAE}·kg⁻¹.

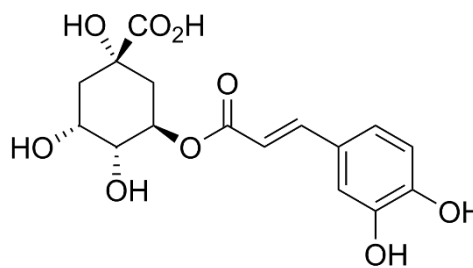
2.2.1.1.1 Fenolové kyseliny

Fenolové kyseliny jsou sloučeniny obsahující alespoň jednu karboxylovou skupinu. Přírodně se vyskytující fenolové kyseliny v rostlinách jsou převážně deriváty kyseliny benzoové nebo deriváty kyseliny skořicové. Mezi přírodní zdroje fenolových kyselin patří například sušená obilná zrna, sušené bobulovité ovoce nebo citrusy [16], [18].

Celkový obsah fenolových kyselin v aronii, v závislosti na analyzované frakci, podle publikace Sójka a kol. [20] činil od 58 do 152 mg/100 g. Aronie obsahuje deriváty kyseliny hydroxyskořicové, zastoupené dvěma izomery kyseliny kofeoylchinové, tj. kyseliny chlorogenové (viz. Obrázek 4) a neochlorogenové (viz. Obrázek 3), přičemž obsah kyseliny chlorogenové bývá průměrně 55 % z celkového obsahu fenolových kyselin. Dalšími fenolovými kyselinami obsaženými v aronii, jsou kyselina kryptochlorogenová, kyselina p-kumarová a její deriváty, kyselina kávová a její deriváty, protokatechová, vanilková, ferulová, salicylová, 4-hydroxybenzoová a ellagová [8], [20].



Obrázek 4: Neochlorogenová kyselina [22]



Obrázek 3: Chlorogenová kyselina [21]

2.2.1.1.2 Flavonoidy

Flavonoidy jsou sekundární metabolity, které jsou považovány za jeden z nejdůležitějších rostlinných pigmentů. Je to pigment, který je zodpovědný za poskytování různých pigmentací v okvětních lístcích květin. U vyšších rostlin mohou flavonoidy mít i další funkce, například symbiotickou fixaci dusíku, jiné flavonoidy mohou být významné pro svoji chuť, jsou to trpké a hořké látky nebo jejich prekurzory [15], [16], [17].

Flavonoidy obsahují v molekule dva benzenové kruhy spojené tří uhlíkovým řetězcem. Jde o uspořádání C₆-C₃-C₆. U většiny flavonoidů je C₃ řetězec součástí heterocyklického (pyranového) kruhu. Podle stupně oxidace C₃ řetězce se dále dělí - viz. Obrázek 2 [17], [18].

V publikaci Sidor a Gramza-Michałowska [8] byl stanoven chromatograficky celkový obsah flavonoidů v aronii na 5560 mg/100 g, zároveň zde je uveden i celkový obsah flavonoidů stanovován spektrofotometricky na 5,3 g CE·kg⁻¹.

V aronii byly podle publikace Kulling a Rawel [7] identifikovány jako hlavní z polyfenolových sloučenin prokyanidiny, což jsou obecně oligomerní a polymerní (epi)katechiny, vytvořené

spojením několika monomerních jednotek. V publikaci Kulling a Rawel [7] je uveden obsah prokyanidinů na 5182 mg/100 g sušených plodů, se stupněm polymerace 23, a na 3992 mg/100 g sušených plodů se stupněm polymerace 14.

Katechiny (flavan-3-oly) mají pravděpodobně negativní vliv na červená antokyanová barviva, způsobují rychlé zežloutnutí nápojů a tento účinek je výraznější, když se zvýší pH.

Další ze skupiny flavonoidů, které jsou zastoupeny v aronii, jsou flavonoly, které představují pouze 1,3 % z celkového počtu fenolových sloučenin. Flavonoly jsou rozmanitou skupinou sloučenin, skládající se hlavně z derivátů kvercetinu. Hlavními deriváty kvercetinu v aronii jsou kvercetin-3-glukosid, 3-galaktosid, 3-rutinosid, 3-robinobiosid a 3-vicianoside. Plody aronie také obsahují flavonoly ve formě isorhamnetin-3-galaktosidu, myricetin a kemferol-3-galaktosid a 3-glukosid [7], [8], [19], [20].

2.2.1.1.3 Anthokyany

Anthokyany jsou nejrozšířenější a početně velice rozsáhlou skupinou flavonoidů, které jsou zodpovědné za pigmentaci. Poskytují mnoha druhům ovoce, zeleniny a květin oranžovou, červenou, fialovou a modrou barvu, tato barviva jsou ve vodě rozpustná a jsou lokalizována v buněčných vakuolách [7], [17].

Plody aronie jsou jedním z nejbohatších rostlinných zdrojů anthokyanů, tento zvýšený obsah je proto hlavním cílem při pěstování aronie, plody obsahují hlavně kyanidinové glykosidy, zastoupené například kyanidin-3-glukosidem, 3-galaktosidem, 3-xylosidem a 3-arabinosidem. Ve velmi malém množství byly detekovány pelargonidin-3-galaktosid a pelargonidin-3-arabinosid. Množství anthokyanů závisí na kultivaru, stádiu dozrávání při sklizni i na kultivačních podmínkách, například přístupu k vodě. V publikaci Sidor a Gramza-Michałowska [8] bylo stanoveno chromatograficky množství anthokyanů ve výliscích v rozmezí 738,7-1221,1 mg/100 g, v publikaci Sójka a kol. [20] bylo chromatograficky ve výliscích stanoveno obdobné množství anthokyanů a to v rozmezí 616-1239 mg/100 g. V plodech aronie představují anthokyany asi 25 % z celkového počtu polyfenolových sloučenin [7], [8], [23].

2.2.1.2 Karotenoidy

Karotenoidy jsou rozšířené žluté, oranžové, výjimečně žlutozelené a červené lipofilní pigmenty. Přítomnost karotenoidů bývá často maskována chlorofyly, se kterými se sdružují v plastidech nazývaných chromoplasty. Většina karotenoidních látek se řadí mezi tetraterpeny, které obsahují osm isoprenových jednotek [17].

V publikaci Razungles a kol. [24] bylo stanoveno celkové množství karotenoidů v aronii na 48,6 mg·kg⁻¹, z výsledků v publikaci vyplývá, že aronie oproti rodu *Rosa* má nižší obsah celkových karotenoidů, ale množství xanthofylů tvořilo vyšší podíl. Xanthofyly vznikají primárně jako produkty biochemické oxidace karotenů, respektive jsou to kyslíkaté deriváty odvozené od alicyklických karotenů [17], [24].

2.2.2 Aromaticky aktivní látky aronie

Aromatické těkavé látky jsou obvykle malé molekuly s nízkou polaritou a relativně vysokými tlaky par. Ovoce vykazuje velkou chemickou rozmanitost v povaze produkovaných těkavých látek. Patří sem sloučeniny s různými chemickými funkčními skupinami, jako jsou aldehydy, ketony, alkoholy, estery, organické kyseliny, furanony nebo terpeny. Těkavý profil v ovoci se během zrání mění, hladiny některých sloučenin zůstávají téměř konstantní, některé dokonce klesají, většina z nich během zrání prudce stoupá. Těkavé sloučeniny jsou důležitým přispěvatelem ke kvalitě ovoce, protože hrají v chuti zásadní roli [25].

V publikaci Romani a kol. [26] byly stanovovány těkavé sloučeniny v džusu z aronie, bylo zde identifikováno 44 těkavých látek. V největším procentuálním množství byly obsaženy (Z)-3-penten-2-on, 1-hexanol a dihydro-3-methylen-5-methyl-2-furanon, obsah terpenů byl pouhých 0,6 %.

V publikaci Hirvi a Honkanen [27] těkavé sloučeniny byly stanoveny z lisovaných plodů aronie, identifikováno zde bylo 48 těkavých sloučenin. Koncentrace sloučenin byly obecně velmi nízké, hlavními identifikovanými sloučeninami byl nitril kyseliny mandlové, kyanovodík a benzaldehyd. Terpeny zde byly identifikovány pouze ve stopových množstvích. Podle této publikace je úplná absence terpenových alkoholů a ketonů pro aronii typická.

V publikaci Burdějová a kol. [28] byly stanovovány těkavé látky z homogenizovaných plodů aronie, identifikováno bylo 39 těkavých sloučenin. Dominujícími skupinami byly alkoholy a aldehydy. Z terpenů byl identifikován pouze limonen.

2.3 Využití aronie

Aronie se využívá v potravinářském, ale také ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Zralé plody aronie mají sladkokyselou, natrpklou chuť, je možné konzumovat je i v syrovém stavu, natrpklou chuť je možné potlačit zmrazením plodů na 24 hodin. Z aronie se vyrábějí především šťávy a sirupy, ale čerstvé plody se zpracovávají i na marmelády, džemy, kompoty, likéry a vína (viz. Obrázek 5, Obrázek 6). Temně červené bobule aronie se vyznačují intenzivně barvicí šťávou, která je buď zpracována samostatně, anebo je použita jako netoxické přírodní potravinářské barvivo k méně barevnému ovoci. Další možností zpracování je plody usušit a tyto sušené plody se využívají k výrobě čaje.



Obrázek 5: Ovocný likér z aronie [29]



Obrázek 6: Různé varianty produktů z aronie [30]

Konzumace plodů aronie, šťávy a extraktů nemá žádné nepříznivé nebo toxické účinky. Díky obsaženým polyfenolovým sloučeninám, především anthokyanům a prokyanidinům, představují plody aronie jeden z nejučinnějších přírodních antioxidantů, které mají pozitivní dopad na celkové zdraví, ale také na nemoci a stavy spojené s výraznou úrovní oxidačního stresu [2], [5], [12].

Na trhu se z aronie prodávají tinktury, sirupy, výživové doplňky ve formě tablet, protože bylo zjištěno, že bobule aronie a produkty z nich mají velký potenciál podporovat zdraví, snižují rizikové faktory metabolického syndromu. Studie prokázaly příznivé účinky aronie na častá onemocnění, jako jsou dyslipidémie, hypertenze, obezita, poruchy metabolismu glukózy, riziko trombózy. Přírodní polyfenoly, obsažené v aronii, včetně anthokyanů, vykazují účinky antimutagenní, hepatoprotektivní, antimikrobiální, antivirové a snižují riziko kardiovaskulárních onemocnění [2], [5], [31].

2.4 Extrakční a separační techniky

Tato diplomová práce se zabývá přípravou extraktů z plodů aronie, v následujících kapitolách jsou popsány extrakční metody, které je možné pro tento účel použít.

Extrakce je separační metoda, při které se jedna či více složek v kapalně nebo pevné fázi rozpouští do jiné kapalně fáze, která se s původní směsí nemísí, nebo se mísí pouze omezeně. Opakovaná extrakce menšími množstvími rozpouštědla je účinnější než jedna extrakce celým množstvím rozpouštědla. Optimální výtěžek z rostlinných materiálů většinou závisí na správném výběru a optimalizaci metody extrakce. Proměnných, které ovlivňují postup extrakce, je mnoho, například povaha rozpouštědla, teplota, pH, čas, molekulární afinita mezi rozpouštědlem a rozpuštěnou látkou, poměr kapaliny k pevné látce a velikost částic. Jejich optimalizace je nutností v zájmu požadovaného množství a kvality regenerovaných sloučenin. Mezi mnoha technikami extrakce, je extrakce pevná látka-kapalina konvenční, a zároveň nejpoužívanější metodou pro získání polyfenolových sloučenin [32], [33], [34].

2.4.1 Konvenční extrakční techniky

Konvenční metody extrakce jsou založeny na extrakci pevná látka-kapalina pomocí různých rozpouštědel, jsou zároveň nejčastěji používané z důvodu jednoduchosti, účinnosti a z hlediska použití v průmyslovém měřítku. Tento typ extrakce představuje několik nevýhod, jako je ztráta některých sloučenin, velká spotřeba organických rozpouštědel, nízká účinnost výroby a vysoká spotřeba času a energie. Alkoholy se obvykle využívají jako rozpouštědla, dále se jako rozpouštědla používají aceton, diethylether a ethylacetát. Ovšem velmi polární fenolové kyseliny, jako jsou kyselina benzoová, kyselina skořicová a jejich deriváty, nemohou být zcela extrahovány pomocí čistého organického rozpouštědla, proto se jako rozpouštědlo doporučuje směs alkohol-voda nebo aceton-voda [34], [35].

2.4.1.1 Macerace

Macerace je nejjednodušší typ extrakce z pevné fáze do kapalně fáze za laboratorní teploty. V tomto procesu je rostlinný materiál, celý nebo rozemletý, umístěn do uzavřené nádoby, stejně jako rozpouštědlo. Mletí rostlinného materiálu na malé částice se používá ke zvětšení povrchu pro správné smíchání s rozpouštědlem. Systém se nechá stát při pokojové teplotě několik hodin, dokonce dnů, za občasněho míchání. Směs se potom odfiltruje, pevný zbytek se lisuje, aby se získala velká část uzavřených roztoků. Takto získaný extrakt se pak dále analyzuje [33], [35].

2.4.1.2 Digesce

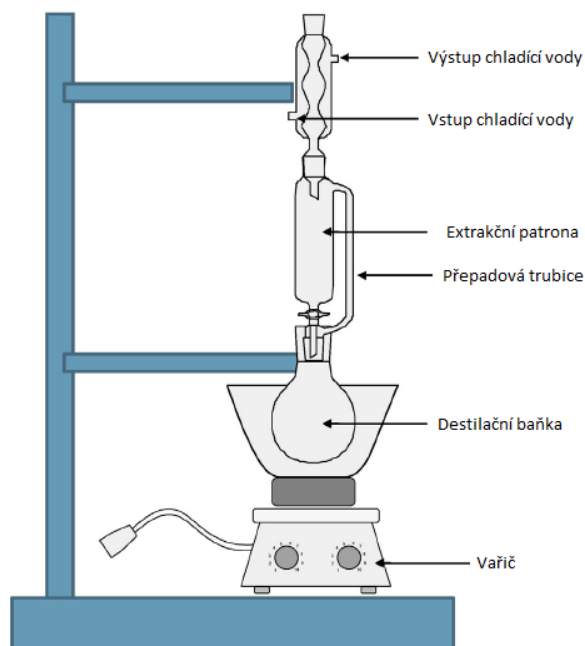
Digesce je upravenou formou macerace, s tím rozdílem, že se do procesu extrakce zapojuje teplo. Extrakce se provádí při zvýšené teplotě, která zvyšuje účinnost rozpouštědla [33].

2.4.1.3 Soxhletova extrakce

Toto zařízení, znázorněno na Obrázek 7, má své hlavní použití v chemii pro rozpouštění slabě rozpustných vzorků z pevných matric. Umožňuje nekontrolovaný a neřízený provoz při efektivní recyklaci malého množství rozpouštědla k rozpuštění většího množství materiálu. Soxhletova extrakce byla nejběžnější metodou pro izolaci bioaktivních sloučenin z rostlin. Silně závisí na charakteristikách matrice a velikosti částic, protože vnitřní difúze může být limitujícím krokem během extrakce.

Soxhletova extrakce má některé atraktivní výhody, například vzorek je opakovaně uveden do kontaktu s čerstvým rozpouštědlem, což usnadňuje vytěsnění rovnováhy přenosu, další výhodou je, že po vyluhování není potřeba filtrace, je to jednoduchá, levná metoda a může se zde extrahovat více množství vzorku než u jiných konvenčních metod. Hlavními nevýhodami jsou dlouhá doba extrakce a velké množství požadovaného rozpouštědla. Kromě toho nelze

ignorovat možnost tepelného rozkladu extrahovaných sloučenin, protože k extrakci obvykle dochází po dlouhou dobu při teplotě varu rozpouštědla [35].



Obrázek 7: Soxhletův extraktor; upraveno podle [33]

2.4.1.4 Destilační extrakce

Destilační extrakce je tradiční metoda extrakce bioaktivních sloučenin, zejména éterických olejů z rostlin. Destilační postup se používá hlavně k extrakci těkavých, aromatických sloučenin z biologické matrice. Tento extrakční postup je ekologický, protože nejsou nutná žádná organická rozpouštědla a extrakci lze provést před dehydratací biologické matrice rostlin. Existují tři typy destilačních extrakčních postupů: Hydrodestilace, destilace vodou a destilace vodní párou. Proces je podobný, pouze se u daných typů liší teplota [33], [35].

2.4.2 Nekonvenční extrakční techniky

V poslední době roste poptávka po nových extrakčních technikách, které jsou šetrné k životnímu prostředí, rychlejší a efektivnější než tradiční extrakční metody. Inovativní techniky jsou koncipovány tak, aby nevýhody konvenčních metod vyřešily. Ačkoli tyto metody mají mnoho výhod pro extrakci biomolekul z různých rostlin, zejména pokud jde o dobu extrakce, spotřebu rozpouštědla, výtěžnost extrakce a reprodukovatelnost, je třeba provést přesné vyhodnocení výrobních nákladů, aby se mohly využít na průmyslové úrovni a mohly být tak vhodnou metodou extrakce [34], [35].

2.4.2.1 Superkritická fluidní extrakce

SFE je extrakce pevného vzorku nadkritickou tekutinou, nejčastěji je využíván oxid uhličitý, protože podmínky k uvedení do kritického stavu jsou mírné (31 °C; 7,38 MPa), zároveň je to bezbarvé, netoxické, nehořlavé, vysoce čisté, nákladově efektivní rozpouštědlo bez zápachu a snadno odstranitelné z rozpuštěných látek. Nízká kritická teplota je výhodná, protože nedochází k degradaci tepelně labilních sloučenin [33], [34], [35].

SFE se využívá jako alternativní metoda ke konvenční extrakci rozpouštědlem při získávání rostlinných extraktů obsahujících polyfenoly. Jedná se o ekologicky bezpečnou techniku, která nabízí několik výhod, jako je získání čistějších extraktů než u jednostupňové extrakce, zvýšení

selektivity vůči určitým sloučeninám a snížení použití organických rozpouštědel. Na druhé straně, kvůli selektivitě extrakčního procesu, vysoce koncentrované extrakty neobsahují vysoké množství všech fenolových sloučenin [34], [35].

2.4.2.2 Ultrazvuková extrakce

Ultrazvuková extrakce se dnes běžně používá v technologii potravin jako náhrada za konvenční extrakční techniky, aby se zlepšilo získávání bioaktivních sloučenin z rostlinných materiálů. Tato technika byla aplikována na několik potravin nebo vedlejších produktů bohatých na polyfenoly, jako jsou hrozny, špenát, kávová zrna a mnoho dalších. V porovnání s konvenčními metodami produkovala ultrazvuková extrakce podobné výtěžky polyfenolových sloučenin, ale za kratší dobu extrakce (6-30 minut), a při nižší spotřebě rozpouštědla [34], [35].

Mechanismus ultrazvukové extrakce zahrnuje dva typy fyzikálních jevů, a to difúzi buněčnými stěnami a vymývání buněčného obsahu, jakmile jsou buněčné stěny ultrazvukem rozbité. Zmenšení velikosti rostlinného materiálu zvýší počet buněk přímo vystavených kavitaci vyvolané ultrazvukem. To zlepší proces difúze, a tím lepší přenos hmoty [33].

2.4.2.3 Mikrovlnná extrakce

Mechanismus mikrovlnné extrakce se skládá ze tří po sobě jdoucích kroků, a to zahájení separací rozpuštěných látek z aktivních míst matrice vzorku, která pracuje při zvýšené teplotě a tlaku, druhým krokem je difúze rozpouštědla přes matrici vzorku a třetím krokem je uvolňování oddělených rozpuštěných látek z matrice vzorku do rozpouštědla. MAE je uznávána jako ekologická zelená technologie z důvodu menšího používání organických rozpouštědel.

Bylo prokázáno, že MAE zvyšuje výtěžnost extrakce, zkracuje dobu extrakce, další výhodou jsou snížené teplotní gradienty a zmenšená velikost zařízení. Vyššího výtěžku extrakce bylo dosaženo například u extrakce polyfenolů a kofeinu z listů zeleného čaje ve velmi krátké době (4 minuty), ve srovnání s 20 hodinami potřebnými u jakékoli jiné extrakční metody [33], [34], [35].

2.4.2.4 Enzymová extrakce

Některé biologicky aktivní látky v rostlinných matricích jsou rozptýleny v buněčné cytoplazmě a některé sloučeniny jsou zadržovány v síti polysacharidů a ligninů pomocí vodíku nebo hydrofobní vazby, které nejsou přístupné rozpouštědlem při běžné extrakci. Proto potřebujeme extrakční metodu, která dokáže obnovit celé volné a neporušené biologicky aktivní látky z biologických materiálů. K překonání tohoto problému byla zavedena enzymatická předúprava, extrakci přes buněčnou stěnu lze zvýšit pomocí enzymů, jako je pektináza nebo celulóza, buď samostatně, nebo ve směsích. Pomocí EAE byly extrahovány například anthokyaninové terpenoidy, anthokyanové taniny, terpenoidní alkaloidy, polyfenoly, terpenoidy a flavonoidové terpenoidové saponiny.

Extrakce pomocí enzymů ukazuje, že jejich použití může vést k vyšším výtěžkům, minimalizaci doby procesu a nižší spotřebě rozpouštědla. EAE se ukázala jako ekonomická a ekologická metodika, protože místo organických rozpouštědel se používá voda [33], [35].

2.5 Antioxidační aktivita

V biologických systémech existují alespoň čtyři obecné zdroje antioxidantů, prvním zdrojem jsou enzymy, například superoxidodismutáza, glutathionperoxidáza a kataláza, dalším zdrojem jsou velké molekuly jako je albumin, feritin a jiné proteiny, dalším významným zdrojem jsou malé molekuly, například kyselina askorbová, tokoferol, karotenoidy, polyfenoly a posledním zmíněným zdrojem jsou některé hormony, například estrogen, angiotensin, melatonin. Antioxidanty jsou molekuly, které pokud jsou přítomny v malých koncentracích ve srovnání s

látkami, které by měly chránit, mohou zabraňovat nebo omezovat oxidační destrukci těchto látek. Antioxidanty v potravě jsou spojeny s prevencí chronických onemocnění souvisejících s oxidačním stresem. Oxidační stres vzniká v důsledku nerovnováhy mezi volnými radikály a antioxidačním obranným systémem v lidském těle, vede k rozvoji chronických a degenerativních poruch, jako je rakovina, kardiovaskulární onemocnění, artritida, předčasné stárnutí, cukrovka, autoimunitní poruchy a neurodegenerativní onemocnění [36], [37], [39].

Volné radikály působí na lipidy, proteiny a nukleové kyseliny, pozměňují jejich strukturu a tím modifikují jejich funkci. Reparativní procesy v organismu nemohou samy plně eliminovat poškození biomolekul, významnou roli při ochraně před volnými radikály hraje prevence, redukce příčin jejich vzniku. Řada malých molekul s antioxidační aktivitou v rostlinách působí jako vychytávače volných radikálů [36], [37], [38].

2.5.1 Metody stanovení antioxidační aktivity

Pro vzájemné porovnávání antioxidačních účinků směsí byl zaveden pojem celková antioxidační aktivita (TAA), která číselně vyjadřuje kapacitu biologického materiálu eliminovat volné radikály. Je-li stanovena významná antioxidační aktivita *in vitro*, nemusí znamenat, že je adekvátně významný účinek i *in vivo*, protože účinek antioxidantů přijímaných potravou je ovlivněn mírou resorpce a dalším metabolismem v trávicím traktu [38].

Měření antioxidační aktivity je důležitou screeningovou metodou pro srovnání oxidačního/redukčního potenciálu. Ke stanovení antioxidační aktivity neexistuje žádná jednoduchá a univerzální metoda, pomocí které by bylo možné aktivitu měřit přesně a kvantitativně. Pro hodnocení antioxidačních kapacit se používá více než 20 chemických metod. Metody založené na přenosu elektronů (ET) jsou TEAC, FRAP a DPPH test. Metody založené na přenosu atomů vodíku (HAT) jsou ORAC, TRAP, TOSC a PSC testy [39], [40].

Antioxidační aktivitu u aronie lze hodnotit řadou metod včetně ORAC, TRAP, DPPH, ABTS a HORAC, které se spoléhají na generování různých radikálů působících různými mechanismy [41].

2.5.1.1 Stanovení celkových polyfenolů

Pro stanovení celkových polyfenolů v rostlinných materiálech bylo vyvinuto několik metod. Tyto metody jsou založeny na různých principech, dochází k určení různých strukturálních skupin přítomných v polyfenolových sloučeninách. Mezi nejpoužívanější spektrofotometrické metody patří stanovení s činidly Folin-Ciocalteu, Folin-Denis, FAS (síran amonno-železitý), test Pruskou modří a upravený vanilínový test. Pro stanovení celkových polyfenolových sloučenin v aronii je v publikacích nejčastěji využíváno stanovení s Folin-Ciocalteuovým činidlem.

Folin-Ciocalteuovo činidlo je směsí fosfomolybdenové a fosfowolframové kyseliny, které se po oxidaci fenolů redukují na modré oxidy, k této reakci dochází za alkalických podmínek, proto se přidává k činidlu uhličitan sodný. Za těchto podmínek je elektron snadno odstraněn z molekuly fenolu a výsledné modré zbarvení má maximální absorpci v oblasti 760 nm a je úměrné celkovému množství původně přítomných fenolických sloučenin. Standardní látkou pro toto stanovení je kyselina gallová nebo ekvivalenty katechinu.

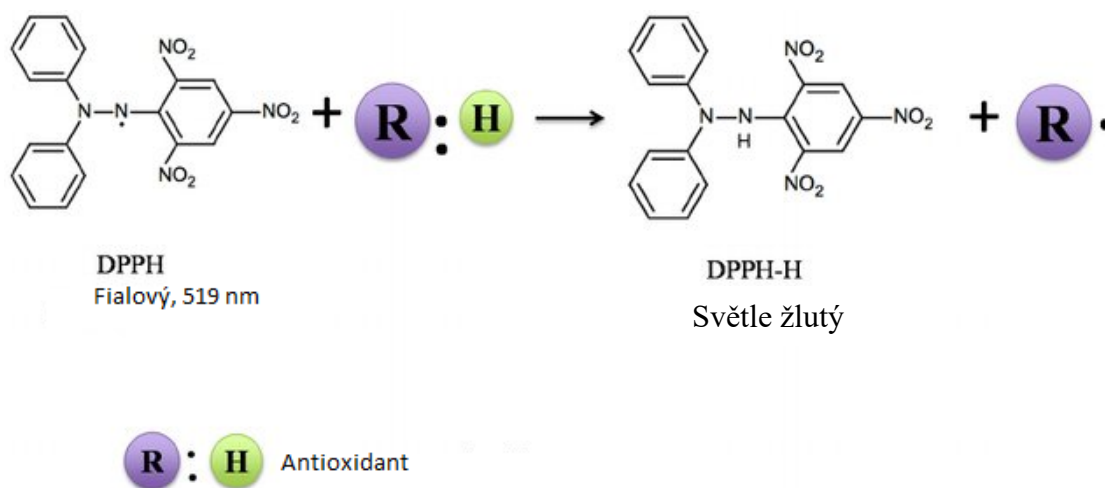
Výhodou metody s Folin-Ciocalteuovým činidlem je, že je snadná, rychlá a vysoce reprodukovatelná (s nižším variačním koeficientem), zároveň je to metoda vysoce používaná jako screeningová metoda pro ovoce, zeleninu, celá zrna a rostliny. Ovšem tato metoda má i svá omezení, činidlo není specifické a detekuje tedy všechny fenolové skupiny, které se nacházejí v extraktu. Činidlo nereaguje specificky pouze s polyfenolovými sloučeninami, ale

reaguje také s jinými oxidovatelnými sloučeninami, jako je kyselina askorbová, aromatické aminy, redukující cukry a aromatické aminokyseliny. Přítomnost proteinů také interferuje s Folin-Ciocalteuovým činidlem, řešením tohoto problému bylo navrženo použití roztoku kyseliny aceton-trichloroctové, která proteiny vysráží [40], [42].

2.5.1.2 DPPH test

Molekula DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl) je za laboratorní teploty stabilní volný radikál, který má tmavě fialové zbarvení v roztoku metanolu a vyznačuje se absorpcí při 515–520 nm. DPPH test je založen na redukcí DPPH ve směsi s antioxidantem, jako je například polyfenol, což vede ke ztrátě jeho fialové barvy na světle žlutou, následkem toho je snížení absorpce při 517 nm, reakce je znázorněna na Obrázek 8. Velikost snížení absorbance a také změna barvy koreluje se schopností antioxidantu poskytovat vodík, koncentrací a aktivitou antioxidantu ve vzorku.

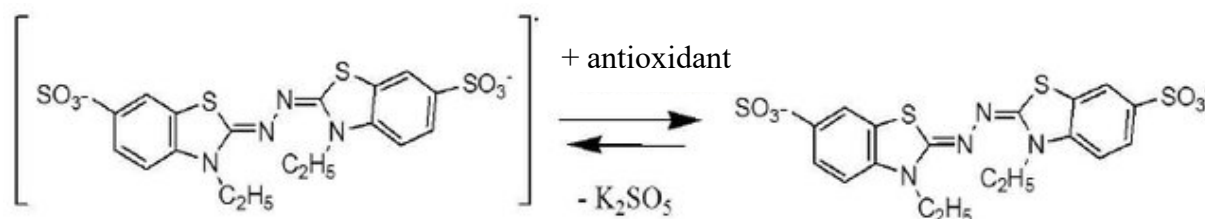
Metoda DPPH se běžně používá, protože se jedná o velmi jednoduchou, citlivou a rychlou metodu, která je velmi vhodná pro screening mnoha vzorků s různou polaritou [40], [42], [44].



Obrázek 8: Reakční mechanismus DPPH s antioxidantem; upraveno podle [43]

2.5.1.3 Metoda TEAC

Tato metoda je založena na schopnosti antioxidantů zachytit stabilní volný radikálový kation ABTS•+ (2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)), modrozelený chromofor s maximální absorpcí při 734 nm, která snižuje jeho intenzitu v přítomnosti antioxidantů. Antioxidanty mohou neutralizovat radikálový kation ABTS•+, generovaný z ABTS, buď přímou redukcí darováním elektronů nebo radikálovým zhašením darováním atomu vodíku, rovnováha těchto dvou mechanismů je obecně určena antioxidační strukturou a pH média. Rozsah zbarvení závisí na délce reakce, vnitřní antioxidační aktivitě a koncentraci ve vzorku. Výsledky získané metodou TEAC se uvádějí jako ekvivalenty troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina), což je ve vodě rozpustný analog vitamínu E [40], [45].



Obrázek 9: Reakce radikálu ABTS v přítomnosti antioxidantu; upraveno podle [46]

2.5.1.4 Metoda ORAC

Metoda ORAC je metodou založenou na přenosu atomu vodíku, slouží k měření celkové antioxidační kapacity sekundárních antioxidantů. ORAC měří schopnost antioxidantů rozrušovat radikály sledováním inhibice oxidace indukované peroxylovými radikály. V tomto testu reaguje peroxylový radikál produkovaný generátorem s fluorescenční sondou, což vede ke ztrátě fluorescence, která se zaznamenává fluorometrem. Na rozdíl od testů FRAP a DPPH kombinuje metoda ORAC dobu inhibice i stupeň inhibice do jednoho množství. Tento test měří kinetiku poklesu fluorescence pro každý vzorek ve srovnání se slepým pokusem vynesím fluorescenční emise proti času.

Nevýhodou je, že tato metoda vyžaduje fluorometry, které nemusí být běžně dostupné v analytických laboratořích, další nevýhodou je, že reprodukovatelnost se snižuje regulací teploty [40], [42], [45].

2.5.1.5 Metoda FRAP

Metoda FRAP je typická metoda založená na přenosu elektronů. Jedná se o kolorimetrický test, který měří redukcí komplexu železitého iontu na intenzivně modře zbarvený komplex železa antioxidanty v kyselém prostředí. Nízké pH způsobuje tvorbu modrého komplexu tripyridyltriazinu železnatého. Antioxidační aktivita se stanoví jako zvýšení absorbance při 593 nm a výsledky se vyjadřují jako mikromolární ekvivalenty železnatého iontu nebo vzhledem k antioxidačnímu standardu.

Výhodou této metody je, že je jednoduchá, rychlá a levná a nevyžaduje speciální vybavení. Nevýhody však spočívají v tom, že FRAP nedokáže detekovat druhy, které působí radikálním zhašením (přenos vodíku), zejména thiolová skupina, kterou obsahují antioxidanty, jako jsou thiole a proteiny [40], [42], [45].

2.6 Metody stanovení antimikrobiální aktivity

Nejpoužívanějšími rostlinnými extrakty s antibakteriálním a antimykotickým účinkem jsou esenciální oleje. Esenciální oleje jsou komplexní přírodní směsi těkavých sekundárních metabolitů, které jsou izolovány z rostlin destilací vodou nebo párou a expresí [47], [48].

Stanovování antibakteriální aktivity je jeden z nejběžnějších *in vitro* testů pro rostlinné extrakty. Stanovení antimikrobiální aktivity je jak finančně, tak i časově náročné, zejména v počátečních stádiích výzkumu, může zahrnovat screening velkého počtu extraktů a/nebo velkého počtu organismů, zároveň může být zapotřebí specializované vybavení. S ohledem na tyto faktory nemusí existovat jedna nejvhodnější metoda, ale spíše výběr dobrých metod, z nichž každá nejlépe vyhovuje daným okolnostem. Nejčastěji se využívají agarová difúzní a diluční metoda [47], [48].

Vhodnost těchto metod pro použití s rostlinnými extrakty však může ovlivnit typ testovaného organismu, koncentrace inokula, typ média a povaha testovaného extraktu (pH, rozpustnost). Metody lze použít k jednoduchému určení, zda je či není přítomna antimikrobiální aktivita, nebo je lze použít k výpočtu minimální inhibiční koncentrace (MIC) [47].

Testované kultury mikroorganismů rostou v živném médiu za optimálních podmínek pro jednotlivé druhy. Využívají se mikroorganismy, které jsou obvykle z mezinárodně uznávaných sbírek čistých kultur, ale mohou být také využity kultury odebrané z různých přírodních prostředí (například mléko, sýr, rostliny). Mikroorganismy musí dosáhnout vhodné růstové fáze a pro test musí být použit specifikovaný počet buněk. Stanovení se vždy opakuje dvakrát až sedmkrát se slepým vzorkem. Růst mikroorganismů lze hodnotit vizuálně nebo instrumentálně.

Běžně používanou technikou, při které se měří změny v optické hustotě rostoucí kultury je turbidimetrie [47], [48].

Extrakt z plodů aronie vykazoval bakteriostatickou aktivitu in vitro proti bakteriím *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*, navíc bylo prokázáno, že extrakt vykazuje antivirovou aktivitu proti viru *influenza A* [5]. Antimikrobiální aktivita u aronie byla stanovována například v publikaci Raudsepp a kol. [49] pomocí agarové difúzní metody, za použití bakterií *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enteritidis*, *Escheria coli*, *Yersinia ruckeri*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Kocuria rhizophila*, *Bacillus subtilis* a *Bacillus pumilus*.

2.6.1 Difúzní metody

Agarová difúzní metoda (známá také jako metoda inhibiční zóny) je nejrozšířenější technikou stanovování antimikrobiální aktivity. Jsou možné dva způsoby provedení, a to s použitím papírového disku anebo s vytvořením jamky v agarovém médiu. Výhodami difúzní metody jsou nízká cena, přesnost, spolehlivost, využití malého množství testované látky a není zapotřebí speciální vybavení. Limitující pro tuto metodu může být velikost inokula, inkubační teplota a těkavé sloučeniny mohou ovlivňovat růst mikroorganismů [47], [48].

Při této metodě se po inkubaci měří zóna inhibice obklopující disk nebo jamku a porovnává se se zónami pro standardní antimikrobiální látku, nebo s literárními hodnotami izolovaných chemikálií nebo podobných extraktů. Jednou z hlavních kritik této metody je, že se spoléhá na schopnost extraktu difundovat agarem a jakákoli složka extraktu, která difunduje pryč z disku, vytvoří koncentrační gradient, který potenciálně vytvoří gradient aktivních antibakteriálních sloučenin [47], [48], [50].

2.6.2 Diluční metody

Diluční metoda je relativně rychlá a levná metoda, která se používá pro bakterie a houby. Jako živné médium se využívá agar, nebo je možno využít i kapalně médium, které se používá zejména pro houby. Při této metodě se zkoušená látka zapracuje ve známých koncentracích do agaru a po usazení se na jeho povrch nanesou bakterie. Petriho misky lze připravit s řadou koncentrací zkoušené látky a rozdělením povrchu agaru na klíny nebo čtverce, a tím lze na jednu misku aplikovat řadu bakteriálních druhů. Tímto způsobem může být v rámci jednoho testu testováno velké množství bakterií. Limitující pro tuto metodu je, že se hydrofobní extrakty mohou oddělit od agaru, tak jako u difúzní metody je limitující pro diluční metodu velikost inokula, inkubační teplota a těkavé sloučeniny, které mohou ovlivňovat růst mikroorganismů. Pokud je k vyhodnocení využit bodovací systém, je obtížné zaručit objektivitu a porovnat tedy jednu sadu výsledků s jinou [47], [48], [50].

2.7 Metody stanovení aromaticky aktivních látek

Pro stanovení aromaticky aktivních látek v extraktech aronie byla použita metoda mikroextrakce tuhou fází ve spojení s plynovou chromatografií a hmotnostním spektrometrem jako detektorem (HS-SPME-GC-MS) viz. Obrázek 10.

Mikroextrakce tuhou fází (SPME) je efektivní metoda vzorkování, která ve spojení s kapalinovou i plynovou chromatografií umožňuje rychlé a kvantitativní stanovení těkavých sloučenin. Plynový chromatograf (GC) je nejčastěji používaným nástrojem v kombinaci se SPME. Jelikož extrakční fáze je netěkavá a do přístroje se zavádějí pouze extrahované analyty, není potřeba složitých injektorů určených pro práci s velkým množstvím par rozpouštědel.

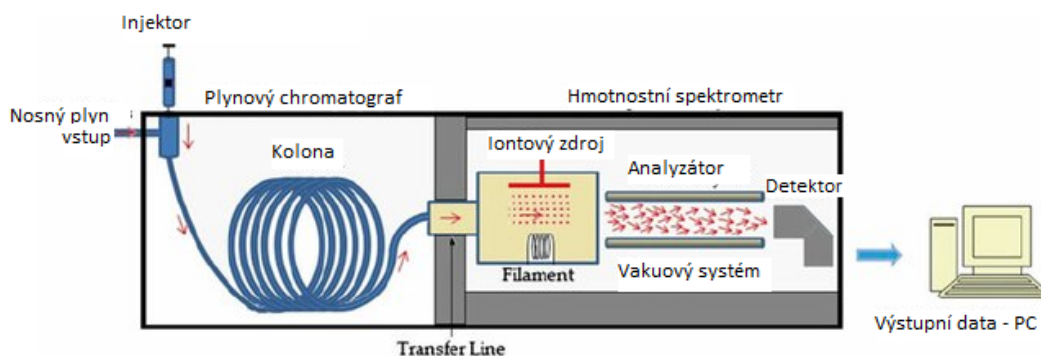
SPME se většinou používá jako headspace technika pro koncentraci těkavých sloučenin z různých plynných, pevných a kapalných potravinářských, environmentálních nebo biologických matric. Výhodou je jednoduchost této metody a absence organického rozpouštědla pro koncentrační proces. Těkavé látky se koncentrují na absorpční vrstvě a poté jsou přeneseny přímo do vstřikovacího portu, kde se oddělí v chromatografickém procesu, v našem případě vzorky byly dále analyzovány pomocí plynové chromatografie (GC) s hmotnostním spektrometrem (MS) [51], [52].



Obrázek 10: Plynový chromatograf TraceTM s hmotnostním detektorem ISOTM LT

Plynová chromatografie je účinná, flexibilní a citlivá analytická separační technika pro hloubkovou chemickou analýzu vzorku. Chromatografie je fyzikální metoda separace mezi mobilní a stacionární fází, vzorky jsou rozpuštěny v mobilní fázi, která prochází stacionární fází. Oddělení různých sloučenin je možné na základě různé afinity k mobilní a stacionární fázi, čímž je ovlivněna jejich distribuce mezi dvěma fázemi a jejich výsledné chování v systému. Plynová chromatografie je schopna separace vysoce komplexních směsí a je založena především na rozdílech bodu varu nebo tlaku par a na polaritě [53], [54].

Prvním krokem plynové chromatografie je zavedení vzorku přes vstřikovací port (injektor). Dále vstupuje do chromatografu nosný plyn (dusík, argon, helium nebo vodík), který je mobilní fází, prochází vstupem a vede vzorek na kolonu, kde je stacionární fáze. Kolona je uzavřena v termostatu s řízenou teplotou. Chromatografická separace probíhá během průchodu vzorku kolonou. Když oddělené složky vzorku opustí kolonu, vstupují do detektoru, který poskytuje elektronický signál úměrný množství eluovaných analytů [53]. Schéma plynového chromatografu ve spojení s hmotnostním spektrometrem je znázorněno na Obrázek 11.



Obrázek 11: Schéma GC-MS; upraveno podle [55]

Hmotnostní spektrometr (MS) poskytuje další strukturální informace týkající se chemického složení detekovaných sloučenin. Informace poskytované hmotnostním spektrometrem jsou v mnoha případech dostatečné k jednoznačné identifikaci neznámé chemické sloučeniny, proto se častěji využívají ke kvalitativním analýzám. Vzorek je zaveden do iontového zdroje přes rozhraní, dochází zde k ionizaci a fragmentaci na mnoho iontů. Tyto ionty zrychlují směrem k analyzátoru, kde jsou tříděny na základě jejich poměru hmotnosti k náboji (m/z). Po oddělení iontů se dostanou k detektoru, kde se měří a zaznamenává množství výskytu. Celý systém je po celou dobu udržován ve vakuu. Výstupem je hmotnostní spektrum ve formě píků, které lze považovat za formu identifikace většiny organických sloučenin, avšak v případě izomerů může být obtížné je odlišit, zejména u stereoizomerů. Nejběžnějším analyzátozem, kde dochází ke rozdělení iontů, je kvadrupól. Kvadrupól je tvořen čtyřmi tyčemi, kde dvojice tyčí naproti sobě tvoří vysokofrekvenční střídavé napětí. Vytváří elektromagnetické pole schopné odchýlit ionty v závislosti na jejich hodnotě m/z a to tak, že do detektoru se při určitém napětí dostanou pouze ionty s určitými hodnotami m/z , ostatní ionty se pohybují po nestabilních drahách a srážejí se s tyčemi [53], [54].

Plynová chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem jako detektorem poskytuje dvojrozměrnou identifikaci, skládající se z retenčního času a z hmotnostního spektra pro každou složku směsi. Tento duální přístup je užitečný pro diferenciaci izomerů, kde dobrá separace GC často kompenzuje obtíže, ke kterým dochází v důsledku neurčitých hmotnostních spekter. Výhodou tohoto spojení je široký dynamický rozsah, linearita odezvy, vysoká robustnost a spolehlivost [54], [56].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité přístroje

- UV-VIS spektrofotometr Helios γ , ThermoSpectronic, Velká Británie
- Mikropipety Biohit a Thermo Scientific, USA
- Sušárna Memmert UFE 550, Memmert, Německo
- Analytické digitální váhy, Helago, Itálie
- SPME vlákno DVB/CAR/PDMS 50/30 μm , Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA
- Plynový chromatograf TraceTM se split/splitless injektorem, Thermo Fisher Scientific Inc., USA
- Hmotnostní detektor ISQTM LT Single Quadrupole, Thermo Fisher Scientific Inc., USA
- Knihovna spekter NIST/EPA/NIH, USA
- Vyhodnocovací systém Xcalibur 2.2, Thermo Scientific Inc., USA
- Běžné laboratorní sklo a vybavení

3.2 Použité chemikálie

- 96 % Ethanol, Penta, Česká republika
- Kyselina gallová, Penta, Česká republika
- Uhličitan sodný bezvodý, Lachema, Česká republika
- Folin-Ciocalteuovo činidlo, Sigma-Aldrich, USA
- ABTS, Sigma-Aldrich, USA

3.3 Analyzované vzorky

Sušené plody aronie byly zakoupeny v kamenné prodejně (firma ProdejnaBylin [57]) (viz Obrázek 12), před macerací byly plody v laboratoři rozdrceny na menší části viz Obrázek 13.



Obrázek 13: Rozdrcené plody aronie



Obrázek 12: Zakoupené balení aronie

3.4 Přípravy, postupy a analýzy

3.4.1 Optimalizace přípravy extraktu

K získání extraktů byla využita macerace, optimalizace tohoto postupu je jedním z cílů této práce (viz kapitola 4.1).

V rámci optimalizace byly zkoumány čtyři faktory, nejvhodnější doba, koncentrace rozpouštědla, poměr navážka/rozpouštědlo a nejvhodnější teplota macerace viz Tabulka 2.

Tabulka 2: Zkoumané podmínky extrakce

Doba	Rozpouštědlo (Etanol)	Navážka	Teplota
20 min	0 %	5 g	20 °C
40 min	40 %	10 g	40 °C
60 min	80 %	15 g	60 °C

Do Erlenmayerových baněk bylo vždy naváženo dané množství sušených drcených plodů aronie, které bylo přelito 50 ml rozpouštědla (voda/etanol). Macerace probíhala při zvolené teplotě a v daných časových intervalech, poté byl macerát přefiltrován. Macerace byla vždy provedena dvakrát a získané filtráty byly uchovány v mrazničce.

3.4.2 Spektrofotometrické stanovení celkových polyfenolů

Nejprve byl připraven roztok Folin-Ciocalteuova činidla, který byl připraven do 100 ml odměrné baňky, přidáním 10 ml činidla a 90 ml destilované vody.

Poté byl připraven nasycený roztok uhličitanu sodného do 100 ml odměrné baňky tak, že bylo naváženo 7,5 g uhličitanu sodného, který byl rozpuštěn v 95 ml destilované vody.

Z přefiltrovaných macerátů byl vždy odebrán vzorek a ten byl desetkrát naředěn. Z naředěného vzorku bylo odebráno 100 μ l do zkumavky, ke kterému byl přidán 1 ml zředěného Folin-Ciocalteuova činidla a 1 ml destilované vody. Směs byla protřepána a ponechána 5 minut stát. Následně byl přidán 1 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného, opět byla směs protřepána a ponechána 45 minut. Absorbance byla měřena proti slepému vzorku při vlnové délce 750 nm.

3.4.2.1 Sestrojení kalibrační řady pro stanovení celkových polyfenolů

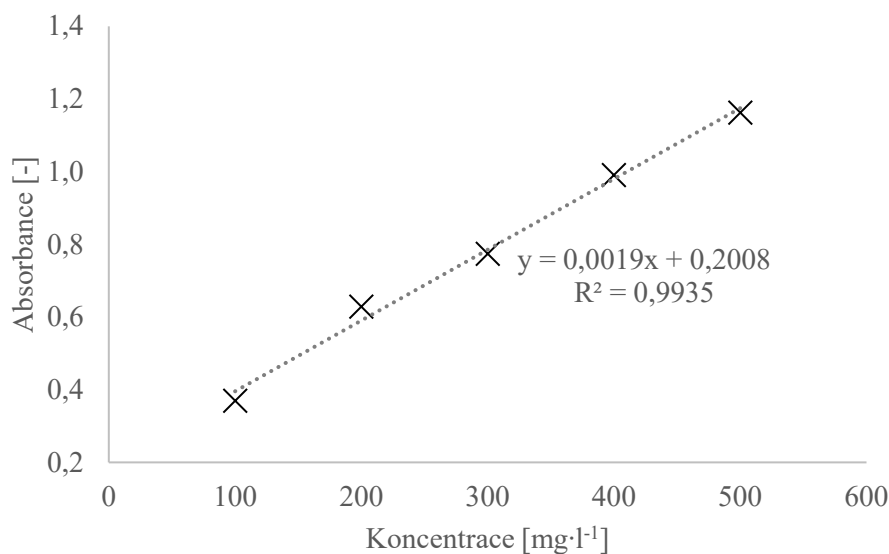
Pro sestavení kalibrační řady byl připraven roztok kyseliny gallové o koncentraci 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a to tak, že bylo naváženo 0,1 g kyseliny gallové do 100 ml odměrné baňky, která byla doplněna destilovanou vodou po rysku. Postupným ředěním pak byla sestavena řada v rozmezí od 0,1-0,5 $\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Do zkumavek bylo napipetováno vždy 100 μ l jednotlivých roztoků kyseliny gallové připravených pro kalibrační řadu, 1 ml desetkrát zředěného Folin-Ciocalteuova činidla a 1 ml destilované vody. Směs byla protřepána a ponechána 5 minut stát za laboratorních podmínek. Následně byl přidán 1 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného, opět byla směs protřepána a ponechána 45 minut. Absorbance byla měřena proti slepému vzorku při vlnové délce 750 nm.

V Tabulka 3 jsou naměřené hodnoty absorbance při 750 nm, které byly naměřeny v závislosti na koncentraci kyseliny gallové. Na Obrázek 14 je znázorněna grafická závislost absorbance na koncentraci kyseliny gallové, z grafu je patrná lineární závislost v měřeném rozsahu.

Tabulka 3: Naměřené absorbance kalibrační řady (A) v závislosti na koncentraci kyseliny gallové (c)

c [mg·l ⁻¹]	A [-]	Směr. odchylka
100	0,370	1,4E-03
200	0,629	2,1E-03
300	0,774	4,2E-03
400	0,991	3,5E-03
500	1,163	5,7E-03



Obrázek 14: Graf závislosti absorbance na koncentraci kyseliny gallové

Výsledky jsou vždy vyjádřeny jako příslušný ekvivalent kyseliny gallové a vypočteny dosazením průměrné absorbance do kalibrační rovnice (1):

$$A = 0,0019 \cdot c + 0,2008 \quad (1)$$

3.4.3 Stanovení aromatických látek

Pro stanovení aromatických látek byla použita metoda HS-SPME-GC-MS. Do vialky byly vždy napipetovány 3 ml daného vzorku extraktu. Vialky byly uzavřeny šroubovacím uzávěrem se vzduchotěsným kaučuk-teflonovým septem a byly umístěny do autosampleru. Poté byla spuštěna analýza pomocí programu Xcalibur 2.2, parametry analýzy jsou uvedeny v Tabulka 4. Získané aromatické aktivní látky byly identifikovány porovnáním hmotnostních spekter s knihovnou spekter NIST/EPA/NIH, obsah látek identifikovaných v extraktech byl vyjádřen semikvantitativně na základě plochy piků.

Tabulka 4: Nastavení podmínek HS-SPME-GC-MS analýzy

Podmínky SPME extrakce	
Doba inkubace (teperace)	10 minut
Teplota extrakce a inkubace (teplota agitátoru)	40 °C
Doba extrakce	20 minut
Agitátor zapnutý	5 sekund
Agitátor vypnutý	60 sekund

Podmínky GC-MS analýzy	
Kapilární kolona	TG-WaxMS (30 m x 0,25 mm x 0,5 µm)
Teplota injektoru (desorpce)	240 °C
Doba desorpce	20 minut
Dávkování	Splitless, ventil uzavřený 10 minut
Nosný plyn	Helium
Průtok nosného plynu	1 ml·min ⁻¹
Teplotní program	40 °C po dobu 1 min., vzestupný gradient 5 °C·min ⁻¹ do 220 °C po dobu 22 minut
Celková doba analýzy	60 minut
Hmotnostní detektor v módu EI	
Energie ionizačních elektronů	70 eV
Teplota iontového zdroje	200 °C
Skenovací rozsah m·z ⁻¹	30-370 amu
Rychlost skenování	0,2 sekund

3.4.4 Stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS•+ radikálu

Roztok radikálového kationtu ABTS•+ o koncentraci 7 mmol·l⁻¹ byl připraven rozpuštěním ABTS v destilované vodě a reakcí s 2,45 mmol·l⁻¹ peroxidisíranem draselným. Připravený roztok byl ponechán přes noc v lednici ve tmě. Na druhý den byl roztok ABTS•+ naředěn 60% etanolem na absorbanci 0,7±0,02 při vlnové délce 734 nm. Z takto zředěného roztoku ABTS•+ byl odebrán 1 ml, který byl smíchán v kyvetě s 10 µl destilované vody a byla ihned změřena absorbance v čase 0 (A₀). Pro stanovení antioxidační aktivity vzorku optimalizovaného extraktu bylo do kyvety napipetováno 1 ml zředěného ABTS•+ a 10 µl vzorku, obsah byl promíchán a ponechán ve tmě po dobu 10 minut. Po 10 minutách byla změřena absorbance (A₁₀). Výsledná absorbance byla vypočítána podle rovnice (2) a výsledná antioxidační aktivita vzorku byla vyjádřena parametrem TEAC, ekvivalentním množstvím Troloxu c_{TEAC} (µg·ml⁻¹).

$$A = A_0 - A_{10} \quad (2)$$

Zároveň bylo vypočítáno procentuální zhášení radikálu podle vzorce (3).

$$\text{Zhášení radikálu (\%)} = 100 \cdot \frac{A_0 - A_{10}}{A_0} \quad (3)$$

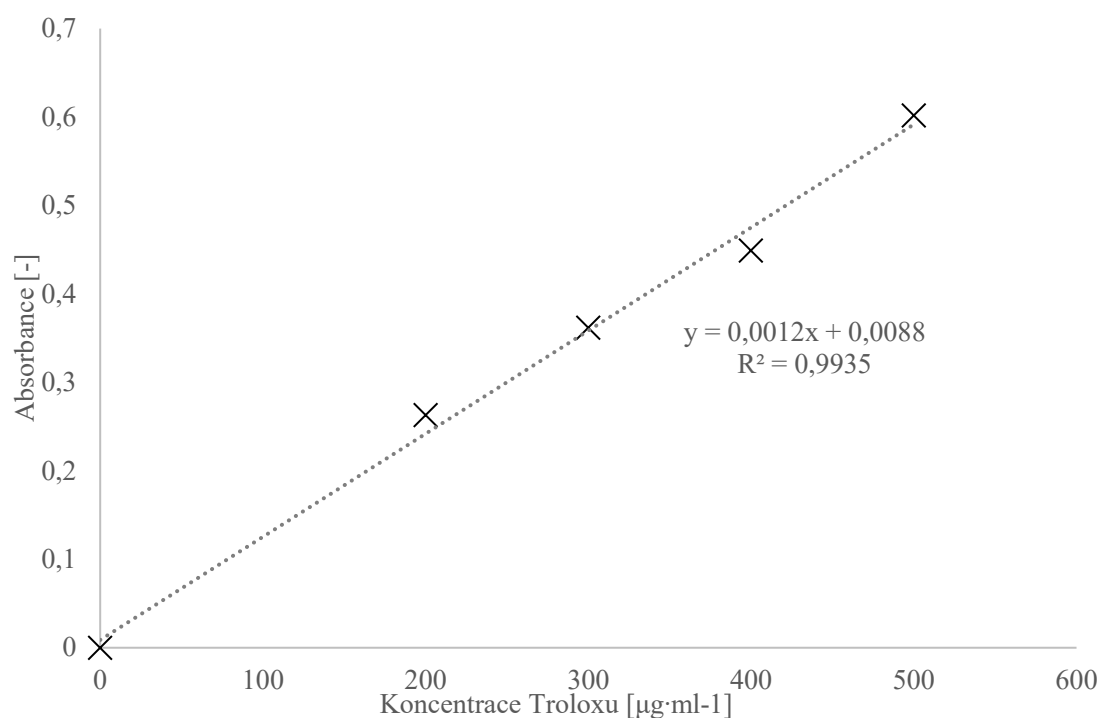
3.4.4.1 Sestrojení kalibrační řady pro stanovení celkové antioxidační aktivity

Pro sestavení kalibrační řady byl připraven roztok Troloxu o koncentraci 1 g·l⁻¹. Postupným ředěním pak byla sestavena řada v rozmezí od 100-500 µg·ml⁻¹ a byla změřena kalibrační závislost absorbance na koncentraci. V kyvetě byl smíchán 1 ml zředěného ABTS•+ s 10 µl roztoku Troloxu, obsah byl promíchán a ponechán ve tmě po dobu 10 minut. Poté byla změřena absorbance při 734 nm.

V Tabulka 5 jsou naměřené hodnoty absorbance při 734 nm, které byly naměřeny v závislosti na koncentraci Troloxu v rozmezí 0-500 µg·ml⁻¹. Na Obrázek 15 je znázorněna grafická závislost absorbance na koncentraci Troloxu, z grafu je patrná lineární závislost v měřeném rozsahu.

Tabulka 5: Naměřené absorbance kalibrační řady (A) v závislosti na koncentraci Troloxu (c)

c [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	A [-]
200	0,263
300	0,362
400	0,449
500	0,602



Obrázek 15: Graf závislosti absorbance na koncentraci Troloxu

Celková antioxidační aktivita byla vyjádřena jako ekvivalentní množství Troloxu a byla vypočtena dosazením výsledné absorbance do kalibrační rovnice (4):

$$A = 0,0012 \cdot c + 0,0088 \quad (4)$$

3.4.5 Stanovení antimikrobiální aktivity

Ke stanovení antimikrobiální aktivity byla použita difúzní jamková metoda v rámci, které byly vybrány tři druhy mikroorganismů, bakterie *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* a kvasinka *Candida glabrata*.

Mikroorganismy byly přeočkovány na šikmý agar, a poté byly přeočkovány z šikmého agaru do tekuté živné půdy (bujónu), kde byly po 24 hodinách připraveny k použití. Do Erlenmayerových baněk bylo připraveno a vysterilováno tuhé živné médium (150 ml), do kterého bylo po ochlazení na teplotu cca 45 °C napipetováno 2 ml suspenze bujónu s příslušnou kulturou mikroorganismu. Takto připravené médium bylo rozléváno do sterilních Petriho misek. Pro *Escherichia coli* bylo ještě přelito již ztuhlé živné médium s inokulem další vrstvou tekutého agaru, jedná se totiž o fakultativně anaerobní mikroorganismus.

Jako tuhé živné médium pro bakterie *Bacillus cereus* a *Escherichia coli* byl použit masopeptonový agar (Nutrient Agar No.2), který byl připraven rozpuštěním 6 g ve 150 ml destilované vody, sterilizace proběhla v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

Pro kvasinku *Candida glabrata* byl jako tuhé živné médium použit sladinový agar (Malt Extract Agar Base), který byl připraven rozpuštěním 7,5 g ve 150 ml destilované vody, sterilizace proběhla v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

Po ztuhnutí byly sterilním korkovrtem vytvořeny čtyři jamky do každé Petriho misky. Do tří z těchto jamek bylo pipetováno 100 µl vzorku extraktu, čtvrtá jamka byla použita jako kontrolní (blank), kde bylo pipetováno 100 µl rozpouštědla (40% etanol). Takto připravené Petriho misky byly kultivovány v termostatu při teplotě 25 °C pro *Bacillus cereus*, *Candida glabrata*, a při teplotě 37 °C pro *Escherichia coli*. Kontrola a měření inhibičních zón probíhaly po třech dnech. Každé měření bylo provedeno ve dvou paralelních Petriho miskách.

3.5 Statistické zpracování výsledků

Výsledky byly zpracovány a vyhodnoceny pomocí MS Excel 2016. Pomocí programu STATISTICA 13 byly stanoveny statistické rozdíly mezi maceráty s využitím parametrické jednofaktorové analýzy rozptylu (ANOVA – Analysis of Variance) s využitím Tukeyho HSD testu, a v případě nehomogenního rozptylu s využitím Kruskal-Wallisového testu. Statistické testy byly provedeny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato práce je součástí rozsáhlé studie zabývající se možností získávání extraktů biologicky aktivních látek z vybraných druhů přírodních rostlinných materiálů a jejich aplikací do potravin, kosmetických a jiných výrobků. Pro experimentální část byla vybrána konkrétně aronie (*Aronia melanocarpa*) jako zástupce drobných bobulových plodů.

4.1 Optimalizace macerace

Na základě studia literatury a provedených předběžných experimentů byla jako extrakční metoda pro získání extraktů aronie zvolena jednoduchá macerace.

Prvním krokem byla optimalizace tohoto postupu; jak již bylo zmíněno, v rámci optimalizace byly zkoumány čtyři faktory, teplota a doba macerace, koncentrace rozpouštědla a poměr navážka/rozpouštědlo. Cílem byl maximální získání biologicky aktivních sloučenin, účinnost a výtěžnost extrakce byla vždy hodnocena podle obsahu polyfenolických a aromaticky aktivních látek.

Podmínky, za kterých byla macerace provedena pro jednotlivé faktory, jsou uvedeny v Tabulce 2 a 6.

Tabulka 6: Podmínky extrakce pro optimalizaci jednotlivých faktorů

Doba macerace	Koncentrace rozpouštědla	Poměr navážka/rozpouštědlo	Teplota macerace
40 % etanol 20 °C 1:10	60 minut 20 °C 1:10	40 % etanol 60 minut 20 °C	40 % etanol 60 minut 1:10

4.1.1 Optimalizace doby macerace

Podle Tabulky 2 a 6 byly připraveny maceráty, znázorněné na Obrázku 16. Z takto připravených macerátů byla v různých časových intervalech měřena absorbance při 750 nm podle kapitoly 3.4.2, a zároveň byly odebrány vzorky pro stanovení aromaticky aktivních látek.

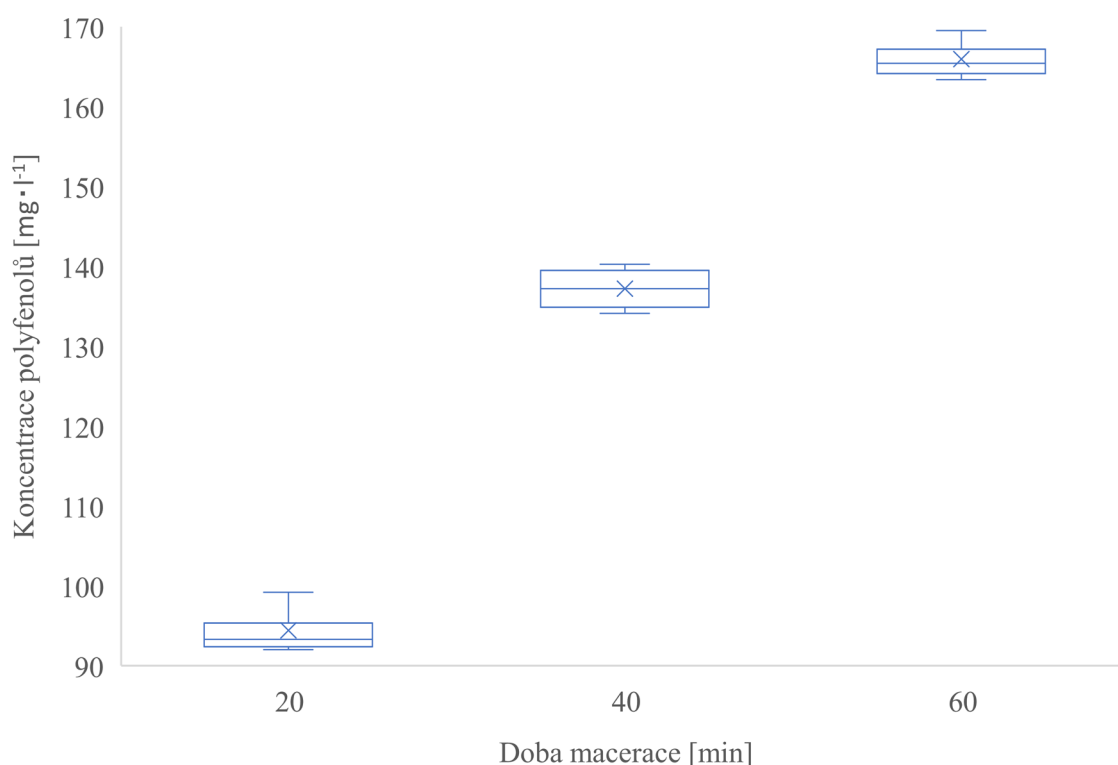
U každého vzorku byl obsah polyfenolických látek měřen třikrát a ze stanovených hodnot byl spočítán průměr, který je uveden v Tabulce 7. Grafická závislost polyfenolických látek na době macerace je znázorněna na Obrázku 17.



Obrázek 16: Maceráty s různou dobou macerace

Tabulka 7: Průměrné absorbance (A) a vypočtené koncentrace polyfenolů (c) v závislosti na době macerace

Doba macerace [min]	Průměr A [-]	Průměr c [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]
20	0,385	$94,43 \pm 3,28$
40	0,468	$137,17 \pm 3,02$
60	0,524	$165,91 \pm 2,72$

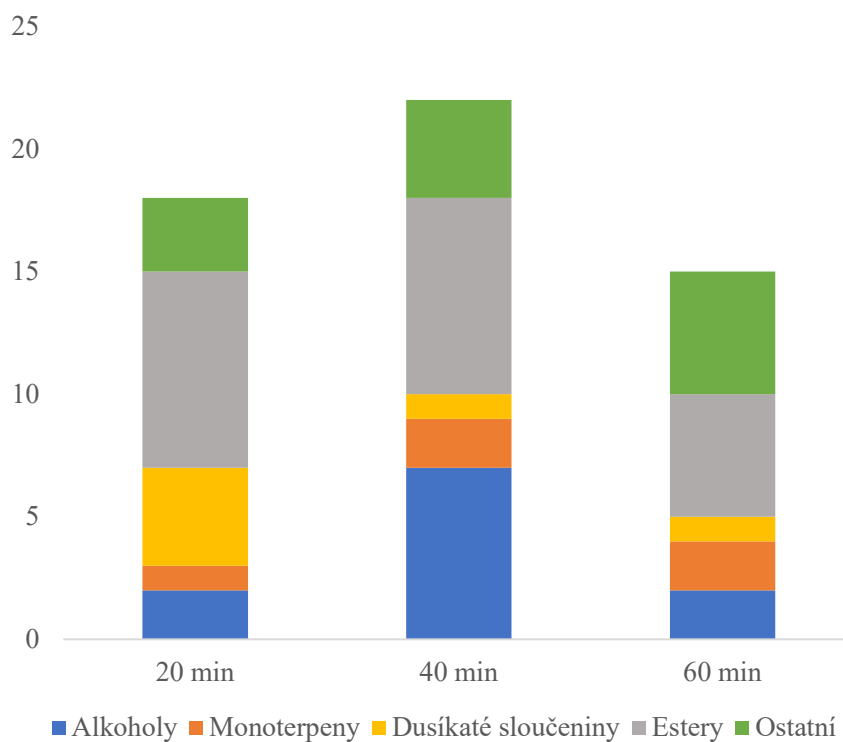


Obrázek 17: Graf závislosti koncentrace polyfenolů na době macerace

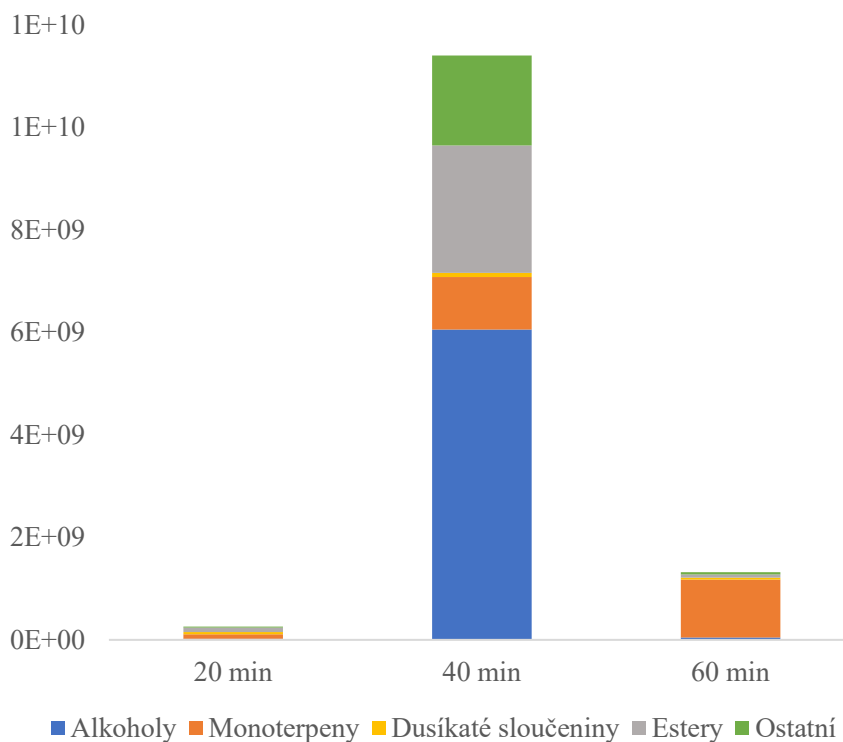
Naměřené hodnoty podle statistického zhodnocení jsou s normální distribucí (Shapiro-Wilkův test, $p > 0,05$) s homogenním rozptylem (Brown-Forsythův test, $p = 0,91$). Podle Tukeyho HSD testu se maceráty statisticky významně liší na hladině významnosti 0,05, a proto jako nejvýhodnější se jeví doba macerace 60 minut, z důvodu nejvyššího obsahu polyfenolů.

Aromaticky aktivní látky byly stanoveny metodou HS-SPME-GC-MS podle kapitoly 3.4.3, každý vzorek byl analyzován dvakrát a plochy píků pro identifikované látky byly zprůměrovány. Na Obrázek 18 je graficky znázorněn počet identifikovaných sloučenin v jednotlivých extraktech a na Obrázek 19 obsah aromaticky aktivních látek (dle ploch píků) v závislosti na době macerace.

Z uvedených grafů vyplývá, že doba macerace 40 minut u sušených drcených plodů aronie je nejúčinnější co do obsahu i počtu aromaticky aktivních látek, kterých bylo identifikováno 22. Bylo zde identifikováno 8 alkoholů (2-hexanol, 1-hexanol, 3-(Z)-hexenol, okt-1-en-3-ol, 2-hexadekanol, dekan-1-ol, 1-dodekanol), 8 esterů (ethyl butyl acetát, O-benzoylbenzohydroximidoyl chlorid, ethylotanoát, methyl 14-(2-octyleklopropyl) tetradekanoát, ethyldekanoát, 1-isobutyl 4-isopropyl 3-isopropyl-2,2-dimethylsukcinát, methyl tetradekanoát, ethyl palmitát), 2 monoterpeny (limonen, camphor) a 5 ostatních látek.



Obrázek 18: Počet aromaticky aktivních látek v závislosti na době macerace



Obrázek 19: Obsah aromaticky aktivních látek v závislosti na době macerace

Po vyhodnocení obou faktorů vyplývá jako optimální, na rozdíl od zisku polyfenolických sloučenin, doba macerace 40 minut.

4.1.2 Optimalizace koncentrace rozpouštědla

Podle Tabulka 2 a 6 byly připraveny maceráty v různých koncentracích etanolu, tyto maceráty jsou znázorněny na Obrázek 20. U takto připravených macerátů byla měřena absorbance při 750 nm podle kapitoly 3.4.2, a zároveň byly odebrány vzorky pro stanovení aromaticky aktivních látek.

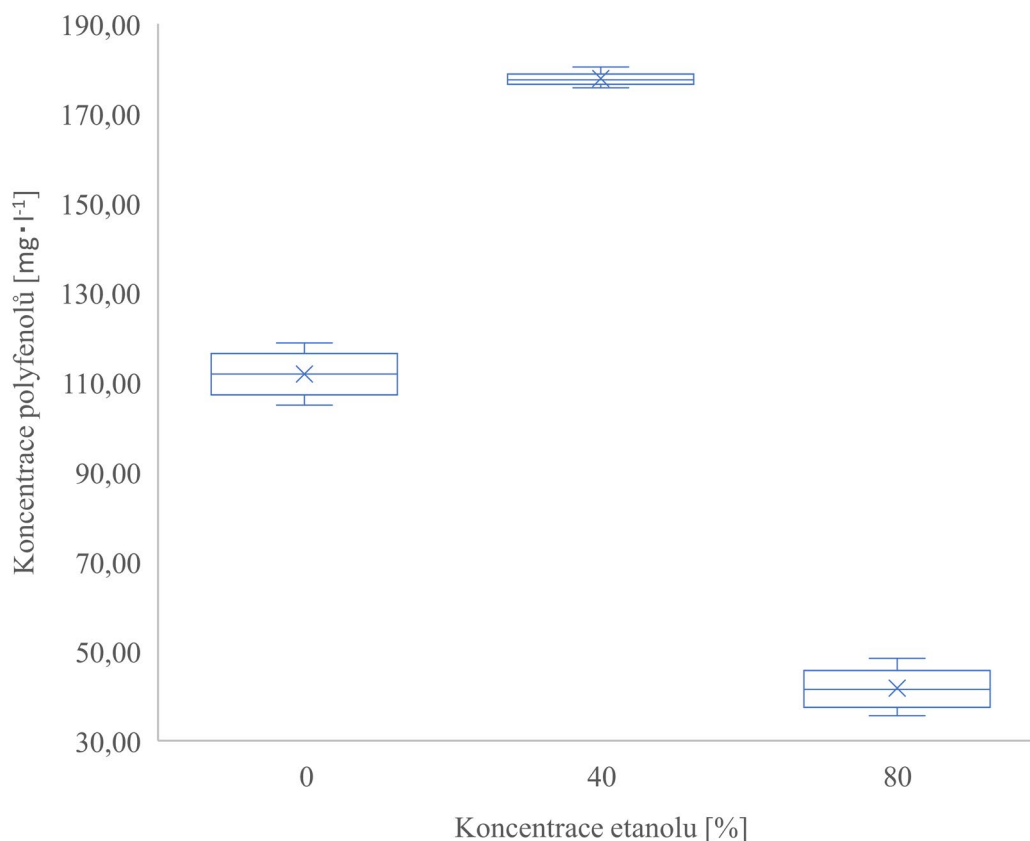
U každého vzorku byl obsah polyfenolických látek měřen třikrát a ze stanovených hodnot byl spočítán průměr, který je uveden v Tabulka 8. Grafická závislost polyfenolických látek na koncentraci etanolu je znázorněna na Obrázek 21.



Obrázek 20: Maceráty s různými koncentracemi etanolu

Tabulka 8: Průměrné absorbance (A) a vypočtené koncentrace polyfenolů (c) v závislosti na koncentraci etanolu

Koncentrace etanolu [%]	Průměr A [-]	Průměr c [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]
0	0,419	$111,76 \pm 6,47$
40	0,547	$177,72 \pm 2,01$
80	0,282	$41,68 \pm 5,91$

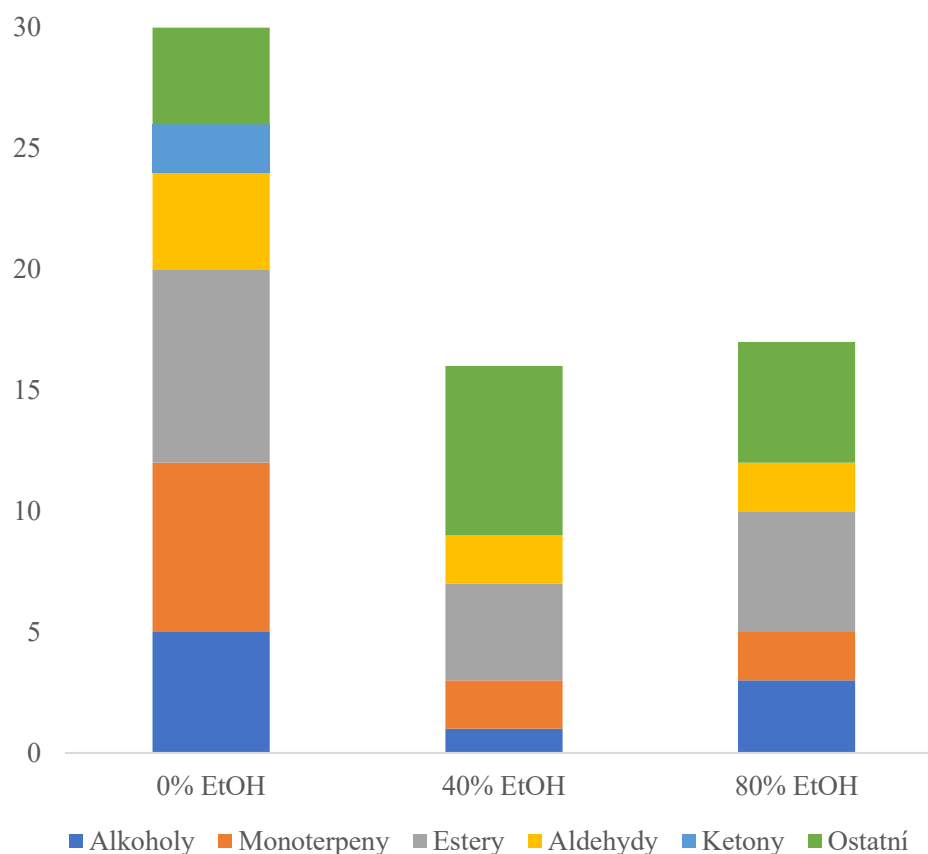


Obrázek 21: Graf závislosti koncentrace polyfenolů na koncentraci etanolu

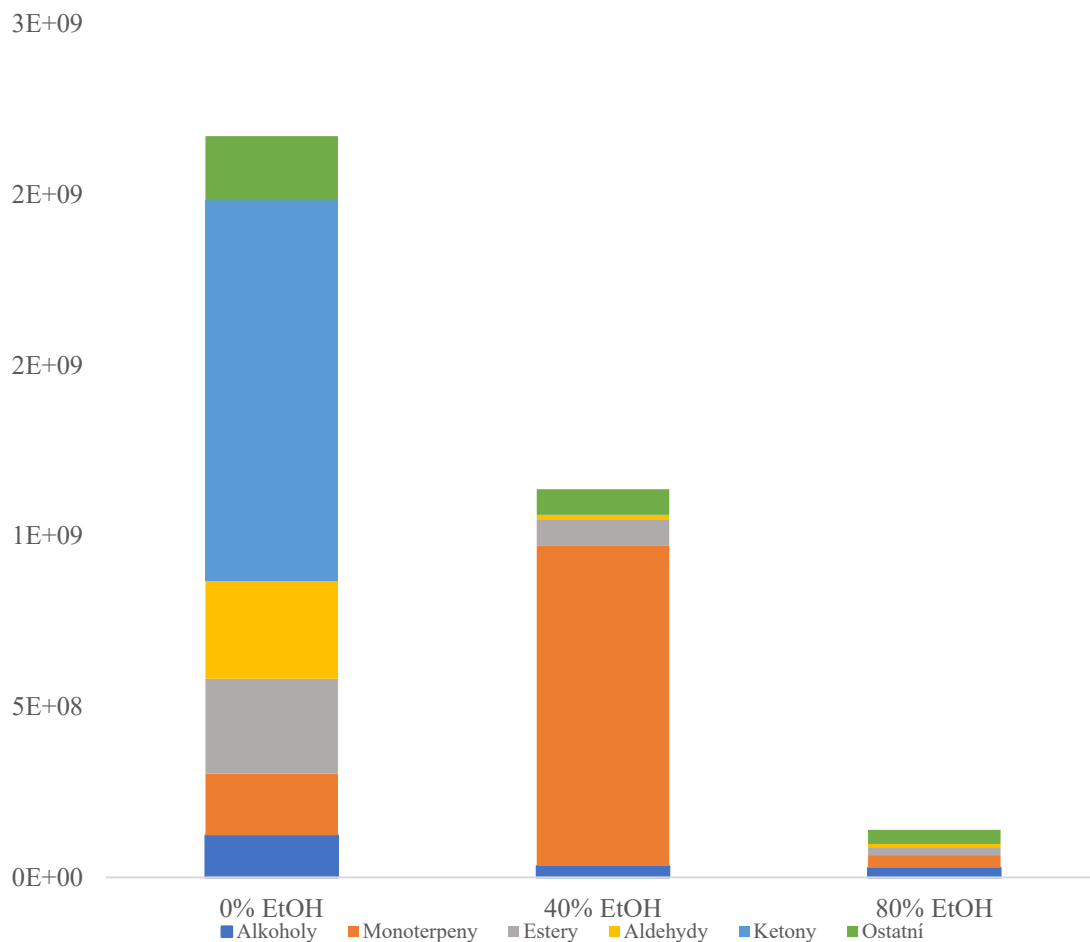
Naměřené hodnoty podle statistického zhodnocení jsou s normální distribucí (Shapiro-Wilkův test, $p > 0,05$) s nehomogenním rozptylem (Brown-Forsythův test, $p = 0,015$). Podle Kruskal-Wallisova testu ($p = 0,0073$) se maceráty statisticky významně liší na hladině významnosti 0,05, a proto jako nejvýhodnější se jeví k maceraci 40% etanol, z důvodu nejvyššího obsahu polyfenolů.

Aromaticky aktivní látky byly stanoveny metodou HS-SPME-GC-MS podle kapitoly 3.4.3, každý vzorek byl analyzován dvakrát a plochy píků pro identifikované látky byly zprůměrovány. Na Obrázek 22 je graficky znázorněn počet identifikovaných sloučenin v jednotlivých extraktech a na Obrázek 23 obsah aromaticky aktivních látek (dle ploch píků) v závislosti na koncentraci etanolu.

Z uvedených grafů vyplývá, že voda je pro sušené drcené plody aronie nejúčinnější rozpouštědlo co do obsahu i počtu aromaticky aktivních látek, kterých zde bylo identifikováno 30. Bylo zde identifikováno 5 alkoholů (2-methylcyklopentanol, 2-pentanol, 2-ethyl-1-hexanol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-(1-oxopropyl)fenol, 1-dodekanol), 8 esterů (methyl hexanoát, allyl 2-ethyl butyrát, methyl kaprylát, E-2-methyl-3-tetradecen-1-ol acetát, ethylen diacetát, ethyl palmitát, 2,2,4-trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyryát, diethylftalát), 7 terpenů (limonen, eukalyptol, α -pinen, o-cymen, α -isomenthon, camphor, linalool), 4 aldehydy (hexanal, nonanal, furfural, benzaldehyd), 2 ketony ((E)-3-penten-2-on, 6-methyl-5-hepten-2-on) a 4 ostatní látky.



Obrázek 22: Počet aromaticky aktivních látek v závislosti na koncentraci etanolu



Obrázek 23: Obsah aromaticky aktivních látek v závislosti na koncentraci etanolu

Po vyhodnocení obou faktorů vyplývá jako optimální koncentrace etanolu 40 %.

4.1.3 Optimalizace poměru navážky k rozpouštědlu

Podle Tabulka 2 a 6 byly připraveny maceráty s různými navážkami aronie, tyto maceráty jsou znázorněny na Obrázek 24. U takto připravených macerátů byla měřena absorbance při 750 nm podle kapitoly 3.4.2, a zároveň byly odebrány vzorky pro stanovení aromaticky aktivních látek.

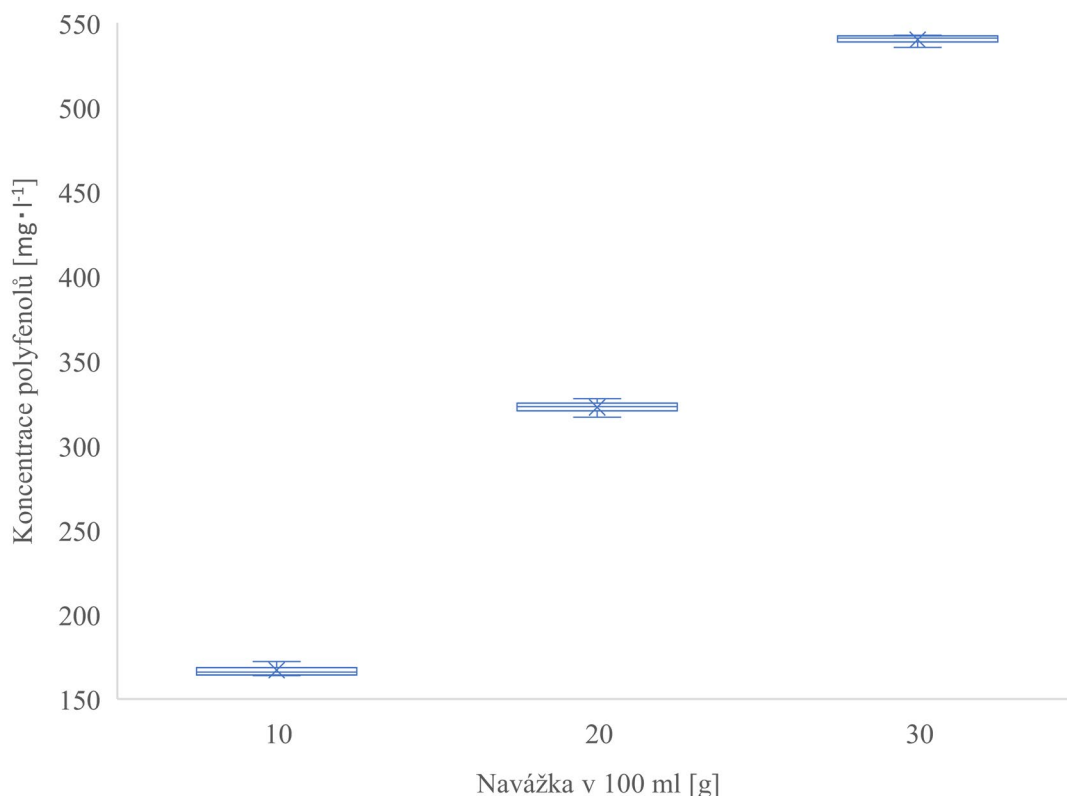
U každého vzorku byl obsah polyfenolických látek měřen třikrát a ze stanovených hodnot byl spočítán průměr, který je uveden v Tabulka 9. Grafická závislost polyfenolických látek na poměru navážka/rozpouštědlo je znázorněna na Obrázek 25.



Obrázek 24: Maceráty s různými poměry navážky/rozpouštědlo

Tabulka 9: Průměrné absorbance (A) a vypočtené koncentrace polyfenolů (c) v závislosti na poměru navážka/rozpouštědlo

Navážka	Průměr A [-]	Průměr c [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]
10 g/100 ml	0,526	166,94 \pm 3,77
20 g/100 ml	0,829	322,48 \pm 4,53
30 g/100 ml	1,260	540,02 \pm 3,28



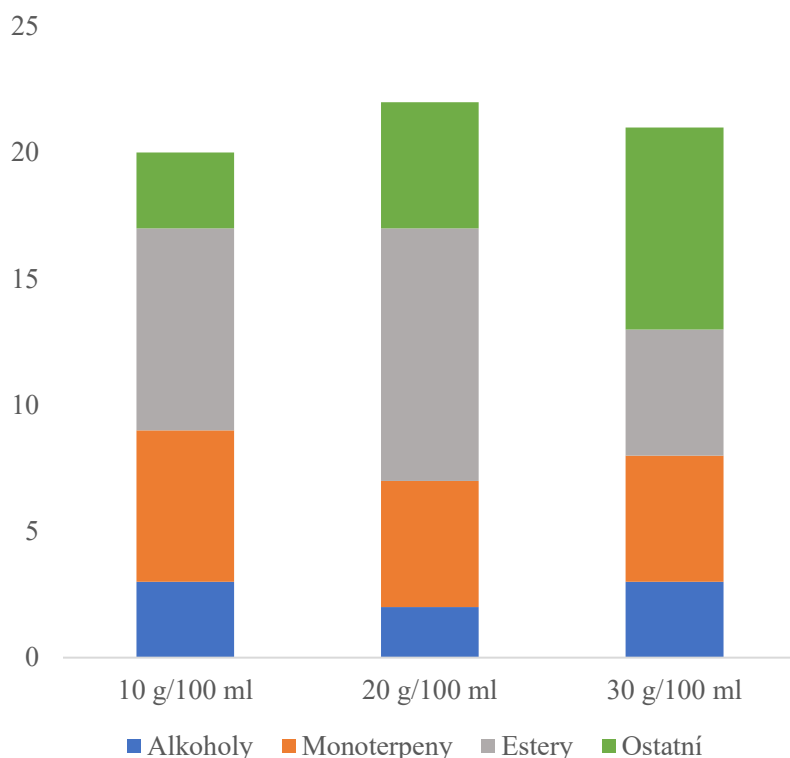
Obrázek 25: Graf závislosti koncentrace polyfenolů na poměru navážka/rozpouštědlo

Naměřené hodnoty podle statistického zhodnocení jsou s normální distribucí (Shapiro-Wilkův test, $p > 0,05$) s homogenním rozptylem (Brown-Forsythův test, $p = 0,85$). Podle Tukeyho HSD testu se maceráty statisticky významně liší na hladině významnosti 0,05, a proto jako nejvýhodnější se jeví použít navážku 30 g v 100 ml, z důvodu nejvyššího obsahu polyfenolů.

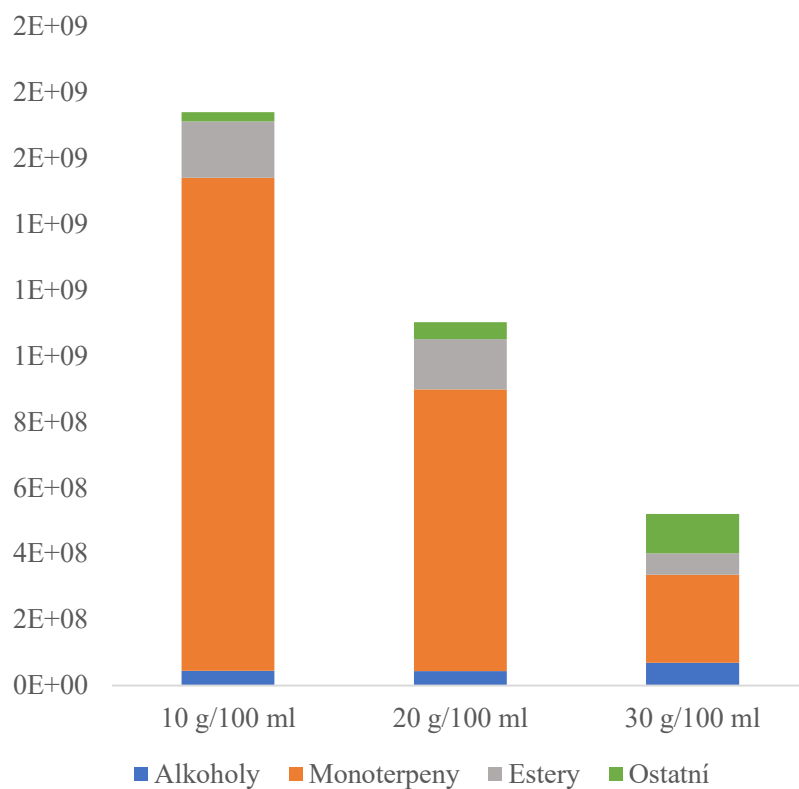
Aromaticky aktivní látky byly stanoveny metodou HS-SPME-GC-MS podle kapitoly 3.4.3, každý vzorek byl analyzován dvakrát a plochy píků pro identifikované látky byly zprůměrovány. Na Obrázek 26 je graficky znázorněn počet identifikovaných sloučenin v jednotlivých extraktech a na Obrázek 27 obsah aromaticky aktivních látek (dle ploch píků) v závislosti na poměru navážka/rozpouštědlo.

Z uvedených grafů vyplývá, že poměr navážka/rozpouštědlo 10 g/100ml je pro sušené drcené plody aronie nejúčinnější co do obsahu aromaticky aktivních látek, kterých zde bylo identifikováno 20. Byly zde identifikovány 3 alkoholy (2-hexanol, 2-hexadekanol, 1-(2-karboxy-4,4-dimethylcyklobutenyl)-1-buten-3-on), 8 esterů (O-benzoylbenzohydroximidoyl chlorid, methyl 14-(2-octylcyclopropyl)tetradekanoát, 3-octyl acetát, (3E)-2-methyl-3-tetradecenyl acetát, methyl 10-methylundekanoát, 1-isobutyl 4-isopropyl 3-isopropyl-2,2-dimethylsukcinát, methyl hexadekanoát, ethyl palmitát), 6 terpenů (limonen, α -pinen, camphor, linalool, isobornyl formát, camphol) a 3 ostatní látky. Počet aromaticky aktivních látek byl

nejvyšší u poměru navážka/rozpouštědlo 20 g/100ml, v extraktu bylo obsaženo více esterů oproti maceraci s poměrem navážka/rozpouštědlo 10 g/100ml.



Obrázek 26: Počet aromaticky aktivních látek v závislosti na poměru navážka/rozpouštědlo



Obrázek 27: Obsah aromaticky aktivních látek v závislosti na poměru navážka/rozpouštědlo

Po vyhodnocení obou faktorů vyplývá jako optimální poměr navážka/rozpouštědlo 20 g/100 ml.

4.1.4 Optimalizace teploty macerace

Podle Tabulka 2 a 6 byly připraveny maceráty s různou teplotou během macerace, tyto maceráty jsou znázorněny na Obrázek 28. U takto připravených macerátů byla měřena absorbance při 750 nm podle kapitoly 3.4.2, a zároveň byly odebrány vzorky pro stanovení aromaticky aktivních látek.

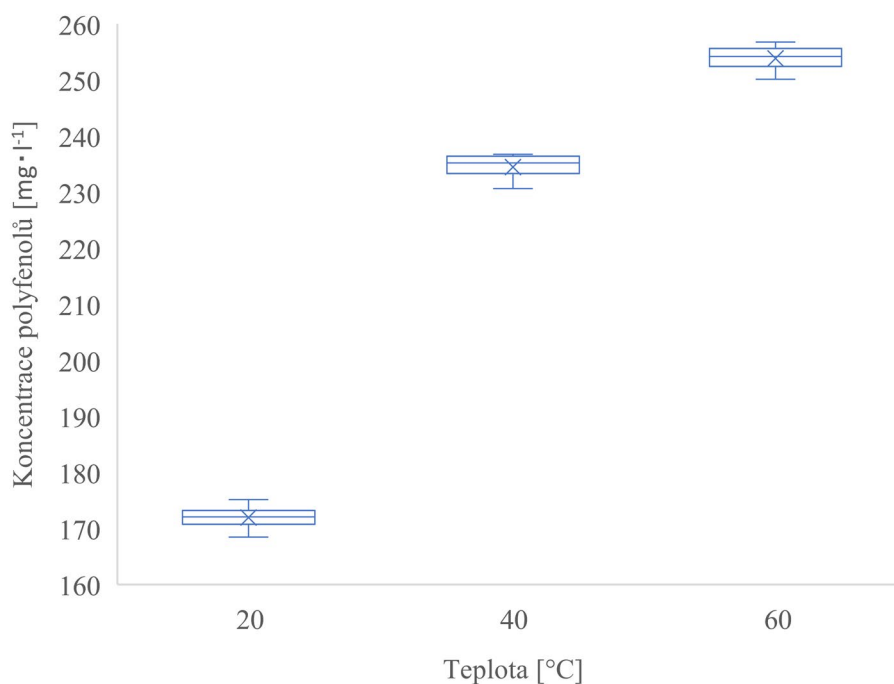
U každého vzorku byl obsah polyfenolických látek měřen třikrát a ze stanovených hodnot byl spočítán průměr, který je uveden v Tabulka 10. Grafická závislost polyfenolických látek na poměru navážka/rozpouštědlo je znázorněna na Obrázek 29.



Obrázek 28: Maceráty s odlišnými teplotami macerace

Tabulka 10: Průměrné absorbance (A) a vypočtené koncentrace polyfenolů (c) v závislosti na teplotě macerace

Teplota [°C]	Průměr A [-]	Průměr c [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]
20	0,536	$171,95 \pm 2,76$
40	0,658	$234,45 \pm 2,80$
60	0,695	$253,82 \pm 2,89$

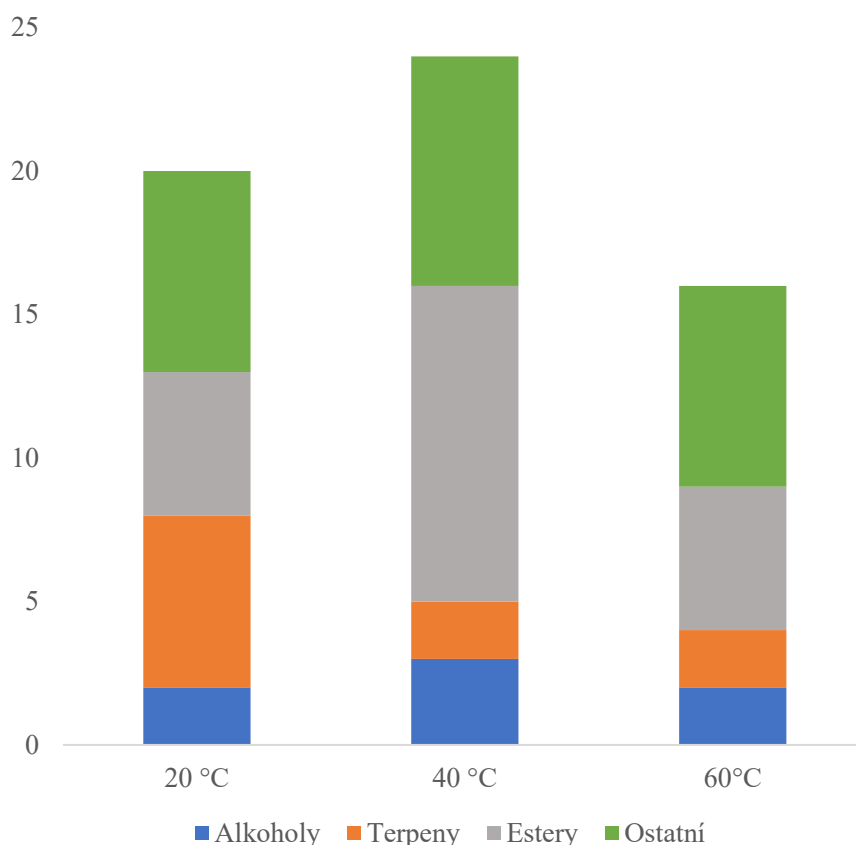


Obrázek 29: Graf závislosti koncentrace polyfenolů na teplotě macerace

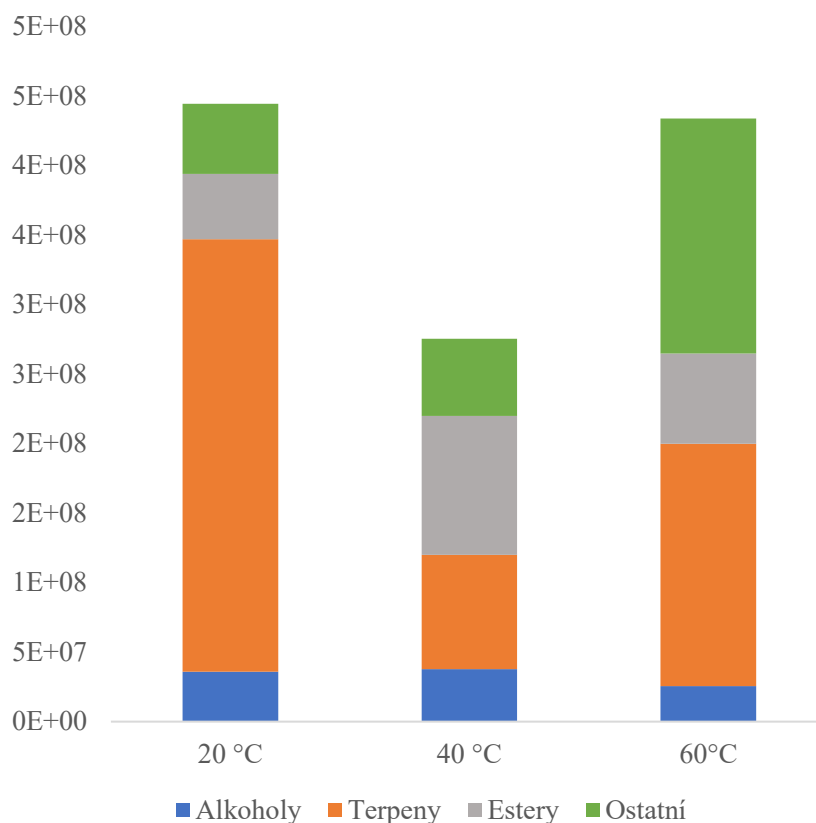
Naměřené hodnoty podle statistického zhodnocení jsou s normální distribucí (Shapiro-Wilkův test, $p > 0,05$) s homogenním rozptylem (Brown-Forsythův test, $p = 0,98$). Podle Tukeyho HSD testu se maceráty statisticky významně liší na hladině významnosti 0,05, a proto jako nejvýhodnější se jeví použití teploty 60 °C, z důvodu nejvyššího obsahu polyfenolů.

Aromaticky aktivní látky byly stanoveny metodou HS-SPME-GC-MS podle kapitoly 3.4.3, každý vzorek byl analyzován dvakrát a plochy píků pro identifikované látky byly zprůměrovány. Na Obrázek 30 je graficky znázorněn počet identifikovaných sloučenin v jednotlivých extraktech a na Obrázek 31 obsah aromaticky aktivních látek (dle ploch píků) v závislosti na teplotě macerace.

Z uvedených grafů vyplývá, že teplota 60 °C během macerace je pro sušené drcené plody aronie nejúčinnější co do obsahu aromaticky aktivních látek, kterých zde bylo identifikováno 16. Byly zde identifikovány 2 alkoholy (2-hexanol, 2-hexadekanol), 5 esterů (O-benzoylbenzohydroximidoyl chlorid, 1-isobutyl 4-isopropyl 3-isopropyl-2,2-dimethylsukcinát, methyl 2,6-bis([(benzyloxy)karbonyl]amino)hexanoát, methyl palmitát, ethyl palmitát), 2 terpeny (limonen, α -kurkumen) a 7 ostatních látek. Počet aromaticky aktivních látek byl nejvyšší u teploty 40 °C, v extraktu bylo obsaženo více esterů oproti maceraci při teplotě 60 °C.



Obrázek 30: Počet aromaticky aktivních látek v závislosti na teplotě macerace



Obrázek 31: Množství aromaticky aktivních látek v závislosti na teplotě macerace

Po vyhodnocení obou faktorů vyplývá jako optimální teplota 60 °C.

4.2 Charakterizace optimalizovaného extraktu

Na základě vyhodnocení získaných výsledků z hlediska obsahu polyfenolických a aromatických látek byl stanoven jako optimální extrakt získaný macerací při teplotě 60 °C, po dobu 40 minut, ve 40% etanolu a navážka 20 g na 100 ml.

Tento extrakt byl znovu připraven ve třech paralelních opakováních a u těchto extraktů byl stanoven celkový obsah polyfenolických látek, obsah aromaticky aktivních látek, antioxidační aktivita a antimikrobiální aktivita.

4.2.1 Celkový obsah polyfenolů v optimalizovaném extraktu

Celkový obsah polyfenolických látek v bobulích aronie závisí na použitém kultivaru, době sklizně, na klimatických podmínkách, ale také na typu vzorku, zda byl obsah stanovován u čerstvých, sušených bobulí nebo u šťávy. Proto se tyto hodnoty v různých studiích liší. Publikace Šnebergová a kol. [12] uvádí celkový obsah polyfenolů v rozmezí 6872–8223 $\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{kg}^{-1}$, ale například publikace Jakobek a spol. [20] stejnou metodou stanovil obsah polyfenolů v různých kultivarech v rozmezí 9012–12055 $\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{kg}^{-1}$. Publikace Samoticha a kol. [58] se zabývala stanovením celkových polyfenolů u sušených plodů aronie, kde bylo rozmezí 4954–7265 $\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{kg}^{-1}$ v závislosti na zvoleném postupu sušení. V našem optimalizovaném extraktu byl stanoven celkový obsah polyfenolů podle kapitoly 3.4.2 na $5237,2 \pm 40,7 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{kg}^{-1}$, což odpovídá spodní hranici uvedené v literatuře.

4.2.2 Aromaticky aktivní látky v optimalizovaném extraktu

Aromaticky aktivní látky byly stanoveny metodou HS-SPME-GC-MS podle kapitoly 3.4.3, byly odebrány tři vzorky, které byly získány ze třech paralelních macerací za optimálních podmínek. Plochy píků pro identifikované látky byly zprůměrovány. V extraktu bylo identifikováno 23 aromaticky aktivních látek, z toho 4 alkoholy, 2 monoterpeny, 7 seskviterpenů, 2 aldehydy, 5 esterů a 3 ostatní látky. Chromatogram je uveden v příloze 8.1.

V Tabulka 11 jsou uvedeny všechny identifikované aromatické látky, včetně retenčních časů (RT) a procentuálního zastoupení. Na Obrázek 32 je graficky znázorněn počet jednotlivých skupin aromaticky aktivních látek identifikovaných v optimalizovaném extraktu a na Obrázek 33 je znázorněn obsah (dle plochy píků) jednotlivých skupin aromaticky aktivních látek.

Z Obrázek 32 vyplývá, že z hlediska počtu identifikovaných aromaticky aktivních látek v optimalizovaném extraktu byly v největším množství zastoupenou skupinou seskviterpeny, procentuální zastoupení této skupiny bylo méně významné (10,3 %).

Z Obrázek 33 jasně vyplývá, že nejvíce zastoupenou skupinou, co do obsahu jsou monoterpeny, konkrétně D-limonen, v publikaci Burdějová a kol. [28] byly stanovovány těkavé látky z homogenizovaných plodů, a jako jediný identifikovaný terpen byl právě D-limonen. Publikace Romani a kol. [26] stanovovala těkavé látky v džusu aronie a zde bylo množství terpenů pouhých 0,6 %, v našem optimalizovaném extraktu bylo procentuálně 59,5 % terpenů.

Druhou nejvíce zastoupenou skupinou v extraktu aronie byly aldehydy, zejména benzaldehyd, což se shoduje s literaturou Hirvi a Honkanen [27], kde byl benzaldehyd jednou z dominantních sloučenin. V publikaci Romani a kol. [26] byl obsah benzaldehydu pouze 2,4 %, naopak v publikaci Kraujalyté a kol. [59] bylo identifikováno 10,5 % benzaldehydu.

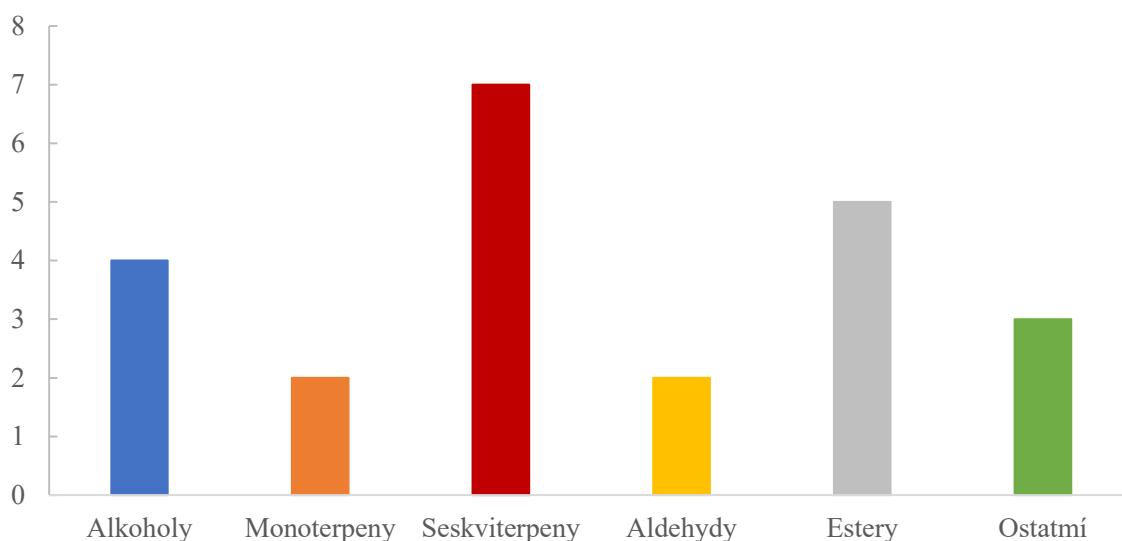
Další skupinou zastoupenou v extraktu byly estery, jejich procentuální zastoupení bylo 5,7 %. Obsah esterů v našem extraktu odpovídá množství identifikované v literatuře Kraujalyté a kol. [59] i Burdějová a kol. [28].

Alkoholy v našem extraktu byly procentuálně zastoupeny v 11,6 %, nejvíce zaujímal 2-hexanol. V nalezených publikacích bylo zastoupení alkoholů nejdominantnější, procentuálně až 50 %, ale žádná publikace nestanovovala aromatické látky z etanolového extraktu aronie.

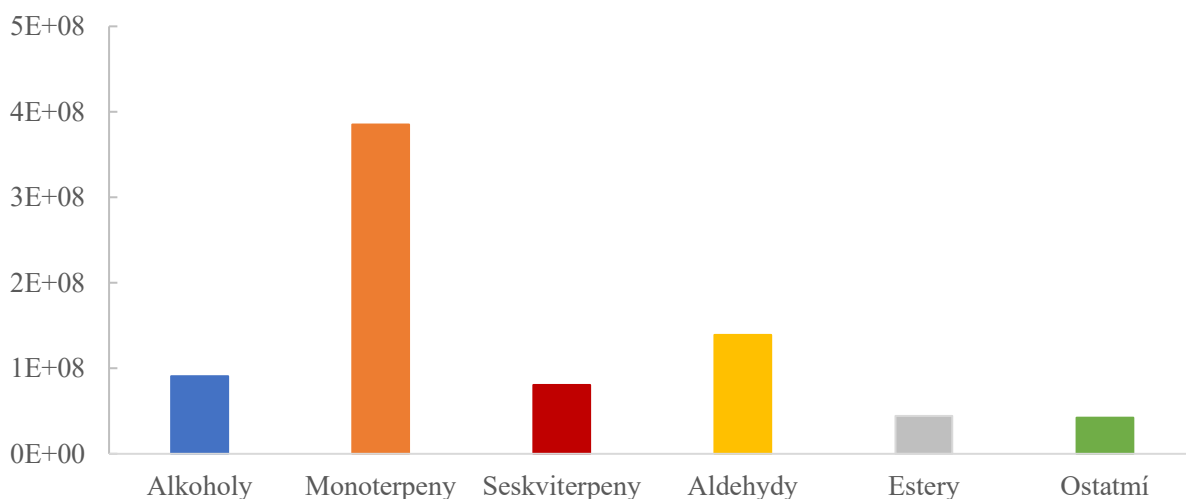
Z ostatních látek byl v našem extraktu identifikován lakton dihydro-3-methylen-5-methyl-2-furanon, který byl identifikován i v publikaci Romani a kol. [26].

Tabulka 11: Aromaticky aktivní látky identifikované v optimalizovaném extraktu

RT [min]	Sloučenina	Procentuální zastoupení	Skupina
8,35	2-Hexanol	6,06	Alkoholy
9,79	D-Limonen	48,79	Monoterpeny
11,90	1,1,3-Trimethyl-3-fenylbutyl thiokyanát	1,36	Estery
15,24	Nonanal	0,91	Aldehydy
17,15	1,3,4-Trihydroxy-5-oxocyclohexankarboxylová kyselina	1,90	Karboxylová kyselina
17,94	E-3-Pentadeken-2-ol	1,48	Alkoholy
18,50	Kamfor	0,45	Monoterpeny
18,60	1-(2-Methoxy-1-methylethoxy)-2-propanol	1,47	Alkoholy
18,87	Benzaldehyd	16,87	Aldehydy
22,55	α -Ylangen	0,81	Seskviterpeny
24,11	D-Amorfen	3,06	Seskviterpeny
24,46	α -Kurkumen	1,68	Seskviterpeny
24,92	α -Muurolen	0,96	Seskviterpeny
25,85	trans-Kalamenen	1,57	Seskviterpeny
26,20	Dihydro-3-methylen-5-methyl-2-furanon	2,28	Laktony
26,62	2,2,4-Trimethyl-1,3-pentandiol diisobutyryát	1,24	Estery
27,65	β -Kalakoren	1,33	Seskviterpeny
28,48	1-Dodekanol	2,61	Alkoholy
30,44	Methyl 8-formyloktanoát	1,85	Estery
33,31	Methyl palmitát	0,71	Estery
33,73	Kadalen	0,89	Seskviterpeny
33,96	Ethyl palmitát	0,51	Estery
40,11	Oktaethylen glykol monododecyl éter	1,22	Étery



Obrázek 32: Počet jednotlivých skupin aromatických látek identifikovaných v optimalizovaném extraktu



Obrázek 33: Obsah jednotlivých skupin aromatických látek identifikovaných v optimalizovaném extraktu

4.2.3 Antioxidační aktivita optimalizovaného extraktu

Antioxidační aktivita byla stanovena metodou TEAC, která používá radikálový kation ABTS•+. Metoda je založena na schopnosti antioxidantů zachytit stabilní volný radikálový kation. Podle kapitoly 3.4.1 byly ve třech paralelních maceracích za stanovených optimálních podmínek připraveny extrakty. U takto připravených macerátů byla měřena absorbance při 734 nm podle kapitoly 3.4.4. Výsledná absorbance byla vypočtena podle rovnice (4).

Tabulka 12: Průměrné naměřené absorbance (A_{10}), vypočtená antioxidační aktivita (c_{TEAC}) a zhášení radikálu

Průměr A_{10} [-]	A [-]	c_{TEAC} [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Zhášení radikálu [%]
0,025	0,613	518,32	96,1
0,035	0,603	509,45	94,5
0,035	0,603	509,74	94,5

V Tabulka 12 jsou naměřené hodnoty absorbance (A_{10}) při 734 nm, vypočtená výsledná absorbance (A), antioxidační aktivita (c_{TEAC}) a procento zhášení radikálu.

Nejdůležitějšími sloučeninami, které jsou odpovědné za vychytávání radikálů, se zdají být polyfenolické látky v souladu s existencí dobré korelace mezi celkovým obsahem polyfenolů a hodnotami antioxidační aktivity [7].

Průměrná antioxidační aktivita v optimalizovaném extraktu aronie byla stanovena na $512,50 \pm 5,04 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Procento zhášení radikálu bylo podle rovnice (2) stanoveno na $95,02 \pm 0,92 \%$.

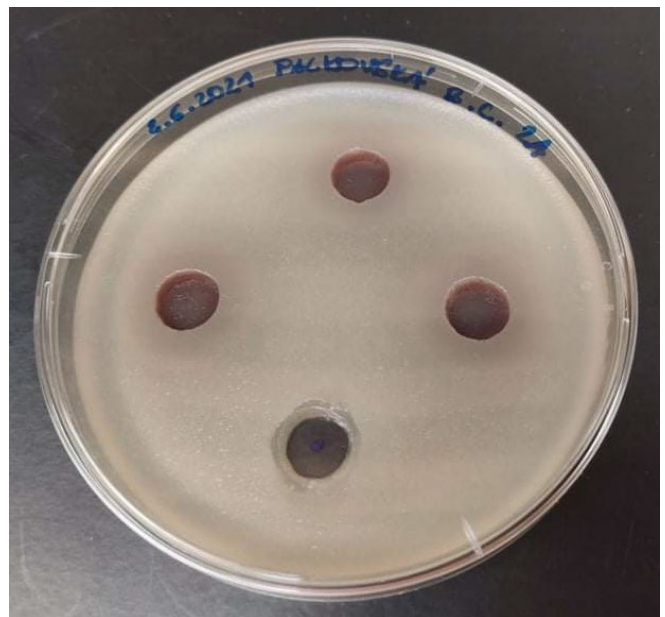
Publikace Rodríguez-Werner a kol. [60] uvádí u plodů aronie antioxidační aktivitu v rozmezí 9,37-10,2 mmol/100 g, u džusu aronie byla aktivita stanovena na 21,2 mmol/100 g. Na druhou stranu v publikaci Samoticha a kol. [58] byla antioxidační aktivita stanovena v rozmezí 41,9-114,7 mmol/100 g hodnoty se lišily v závislosti na použité metodě sušení plodů aronie. V našem extraktu po převedení jednotek byla antioxidační aktivita stanovena na $20,5 \pm 0,2 \text{ mmol}/100 \text{ g}$. Tento rozdíl může být způsoben použitím jiných podmínek

pro extrakci, například použitím jako rozpouštědla metanol, dále mohly antioxidační aktivitu ovlivnit i druh použitého kultivaru, doba sklizně atd.

4.2.4 Antimikrobiální aktivita optimalizovaného extraktu

Antimikrobiální aktivita extraktu byla stanovena difúzní jamkovou metodou podle kapitoly 3.4.5 s použitím tří druhů mikroorganismů, bakterie *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* a kvasinka *Candida glabrata*.

Pro všechny mikroorganismy bylo zvoleno pozorování po 72 hodinách kultivace, avšak u žádného z nich nedošlo k vytvoření inhibičních zón, lze říci, že byly proti analyzovanému extraktu rezistentní. Naopak překvapivě okolo jamek vzniklo spíše podpůrné prostředí pro růst mikroorganismů, zejména u *Escherichia coli*. Lze se domnívat, že extrakty nebyly pro znatelný antimikrobiální účinek dostatečně koncentrované. Stanovení antimikrobiální aktivity s jednotlivými mikroorganismy je znázorněno na Obrázek 34- 36.



Obrázek 34: Optimalizovaný extrakt aronie proti *Candida glabrata* Obrázek 35: Optimalizovaný extrakt aronie proti *Bacillus cereus*



Obrázek 36: Optimalizovaný extrakt aronie proti *Escherichia coli*

5 ZÁVĚR

Hlavním cílem této diplomové práce byla optimalizace macerace sušených plodů aronie a následná charakteristika optimálního macerátu.

Cílem optimalizace bylo stanovit optimální podmínky k přípravě macerátu, tak aby byla co největší výtěžnost polyfenolů, a zároveň co největší výtěžnost aromaticky aktivních látek. Byla zkoumána nejvhodnější teplota a doba macerace, koncentrace etanolu a poměr navážka/rozpouštědlo.

S rostoucí dobou macerace byl pozorován vyšší zisk polyfenolických látek, ale tato závislost neplatila pro aromaticky aktivní látky, kde největší zisk byl při době 40 minut, při 60 minutách bylo větší množství monoterpenů, ale ostatní látky byly ve stopovém množství.

Koncentrace etanolu měla významný vliv na obsah jak polyfenolických látek, tak i aromaticky aktivních látek. U aromaticky aktivních látek bylo největší množství obsaženo ve vodě, kde bylo identifikováno 30 látek, s největším zastoupením ketonů (51 %), které se v jiných koncentracích etanolu ani nevyskytovaly. Ovšem ve vodném macerátu bylo obsaženo čtyřikrát méně terpenů než v 40 % etanolu.

S rostoucí teplotou rostl obsah celkových polyfenolů, tato závislost neplatila pro aromaticky aktivní látky, kde obsah látek v macerátu při 20 °C a 60 °C byl srovnatelný, významnější rozdíl byl v obsahu terpenů, kde v macerátu při 20 °C bylo identifikováno velké množství kamforu, který v maceraci při 60 °C nebyl přítomen.

Vliv poměru navážky a rozpouštědla z hlediska obsahu polyfenolů rostl, ovšem z hlediska obsahu aromaticky aktivních látek naopak klesal, což mohlo být způsobeno menší kontaktní plochou aronie s rozpouštědlem.

Na základě posouzení uvedených výsledků byly jako optimální podmínky pro zisk extraktu z aronie stanoveny: doba macerace 40 minut, 40 % etanolem, při 60 °C s poměrem navážky a rozpouštědla 1:5.

Získaný optimální macerát byl charakterizován z hlediska obsahu celkových polyfenolů, aromaticky aktivních látek, antioxidační a antimikrobiální aktivity.

Celkový obsah polyfenolů byl stanoven na $5237,2 \pm 40,7 \text{ mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{kg}^{-1}$, antioxidační aktivita metodou TEAC na $512,50 \pm 5,04 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ s procentem zhášení radikálu $95,02 \pm 0,92 \%$. U optimálního macerátu nebyla pozorována antimikrobiální aktivita, testované mikroorganismy byly vůči němu rezistentní. V macerátu bylo identifikováno 24 aromaticky aktivních látek, z toho 4 alkoholy, 2 monoterpeny, 7 seskviterpenů, 2 aldehydy, 6 esterů a 3 ostatní látky. V největším množství byly zastoupeny: D-limonen (48,79 %), benzaldehyd (16,87 %) a 2-hexanol (6,06 %).

Výsledky této práce potvrzují, že aronie, resp. její extrakt, vykazuje antioxidační aktivitu a obsahuje spektrum atraktivních aromatických látek, a má tedy dobrý potenciál pro využití v praxi, což bylo potvrzeno aplikací získaného extraktu do želatinových cukrovinek v rámci navazující diplomové práce Bc. Matěje Rychetského.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] DOLEJŠÍ, Antonín, Vladimír KOTT a Lubomír ŠENK, 1991. *Méně známé ovoce*. Praha: Brázda. Zahrádka (Brázda). ISBN 80-209-0188-4.
- [2] ČUJÍČ, Nada, Nevena KARDUM, Katarina ŠAVIKIN, Gordana ZDUNIĆ, Teodora JANKOVIĆ a Nebojša MENKOVIĆ, 2018. Potential of Chokeberry (*Aronia Melanocarpa* L.) as a Therapeutic Food. *Therapeutic Foods*. Elsevier, 2018, 209-237. ISBN 9780128115176. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-811517-6.00007-6
- [3] Temnoplodec černoplodý: Kouzelné bylinky. In: Česká televize [online]. [cit. 2021-03-19]. Dostupné z: <https://www.ceskatelevize.cz/porady/10744345634-kouzelné-bylinky/7669-bylinky/32853-temnoplodec-cernoplody/>
- [4] SHAHIDI, Fereidoon a Cesarettin ALASALVAR, [2016]. *Handbook of functional beverages and human health*. 20160120. Boca Raton: CRC Press. Nutraceutical science and technology. ISBN 978-1-4665-9642-9.
- [5] JAREMICZ, Zbigniew a Maria LUCZKIEWICZ, 2010. *Aronia Plants: A Review of Traditional Use, Biological Activities, and Perspectives for Modern Medicine*. Journal of Medicinal Food. 13(2), 255-269. DOI: 10.1089/jmf.2009.0062. ISSN 1096-620X. Dostupné také z: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/jmf.2009.0062>
- [6] U.S. Department of Agriculture [online]. 2009 [cit. 2021-03-19]. *Plant database*. Dostupné z: <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=ARME6>
- [7] KULLING, Sabine a Harshadai RAWEL, 2008. Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) – A Review on the Characteristic Components and Potential Health Effects. *Planta Medica*. 74(13), 1625-1634. DOI: 10.1055/s-0028-1088306. ISSN 0032-0943. Dostupné také z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0028-1088306>
- [8] SIDOR, Andrzej a Anna GRAMZA-MICHAŁOWSKA, 2019. Black Chokeberry *Aronia melanocarpa* L.—A Qualitative Composition, Phenolic Profile and Antioxidant Potential. *Molecules*. 24(20). ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules24203710>
- [9] CVETANOVIĆ, Aleksandra, Gökhan ZENGIN, Zoran ZEKOVIĆ, Jaroslava ŠVARC-GAJIĆ, Slavica RAŽIĆ, Ana DAMJANOVIĆ, Pavle MAŠKOVIĆ a Milan MITIĆ, 2018. Comparative in vitro studies of the biological potential and chemical composition of stems, leaves and berries *Aronia melanocarpa*'s extracts obtained by subcritical water extraction. *Food and Chemical Toxicology*. 121, 458-466. DOI: 10.1016/j.fct.2018.09.045. ISSN 02786915. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691518306896>
- [10] TANAKA, Tsuneo a Akira TANAKA, 2001. Chemical Components and Characteristics of Black Chokeberry. *NIPPON SHOKUHIN KAGAKU KOGAKU KAISHI*. 48(8), 606-610. DOI: 10.3136/nskkk.48.606. ISSN 1341-027X.
- [11] CVETKOVIĆ, Dragan, Ljiljana STANOJEVIĆ, Jelena ZVEZDANOVIĆ, Saša SAVIĆ, Dušica ILIĆ a Ivana KARABEGOVIĆ, 2018. *Aronia* leaves at the end of harvest season — Promising source of phenolic compounds, macro- and

- microelements. *Scientia Horticulturae*. **239**, 17-25. DOI: 10.1016/j.scienta.2018.05.015. ISSN 03044238. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304423818303418>
- [12] ŠNEBERGROVÁ, J., H. ČÍŽKOVÁ, E. NERADOVÁ, B. KAPCI, A. RAJCHL a M. VOLDŘICH, 2014. Variability of characteristic components of aronia. *Czech Journal of Food Sciences*. **32**(1), 25-30. ISSN 12121800.
- [13] SHRINET, Kriti, Ritika K. SINGH, Avinash K. CHAURASIA, Alok TRIPATHI a Arvind KUMAR, 2021. Bioactive compounds and their future therapeutic applications. *Natural Bioactive Compounds*. Elsevier, 2021, 337-362. ISBN 9780128206553.
- [14] NEILSON, Andrew P. a Mario G. FERRUZZI, 2013. Bioavailability and Metabolism of Bioactive Compounds from Foods. *Nutrition in the Prevention and Treatment of Disease*. Elsevier, 2013, 407-423. ISBN 9780123918840.
- [15] HOOPER, B. a R. FRAZIER, 2012. Polyphenols in the diet: friend or foe? *Nutrition Bulletin*. **37**(4), 297-308. DOI: 10.1111/j.1467-3010.2012.02001.x. ISSN 14719827.
- [16] KARDUM, Nevena a Maria GLIBETIC, 2018. *Polyphenols and Their Interactions With Other Dietary Compounds: Implications for Human Health*. Elsevier, 2018, 103-144. Advances in Food and Nutrition Research. DOI: 10.1016/bs.afnr.2017.12.001. ISBN 9780128149904.
- [17] VELÍŠEK, Jan, 2002. *Chemie potravin 3*. Vyd. 2. upr. Tábor: OSSIS. ISBN 80-866-5903-8.
- [18] MUKHERJEE, Chaiti a Swati CHAKRABORTY, 2021. Study of dietary Polyphenols from natural herbal sources for providing protection against Human Degenerative Disorders. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. DOI: 10.1016/j.bcab.2021.101956. ISSN 18788181.
- [19] JAKOBEK, Lidija, Mato DRENJANČEVIĆ, Vladimir JUKIĆ a Marijan ŠERUGA, 2012. Phenolic acids, flavonols, anthocyanins and antiradical activity of “Nero”, “Viking”, “Galicianka” and wild chokeberries. *Scientia Horticulturae*. **147**, 56-63. DOI: 10.1016/j.scienta.2012.09.006. ISSN 03044238.
- [20] SÓJKA, Michał, Krzysztof KOŁODZIEJCZYK a Joanna MILALA, 2013. Polyphenolic and basic chemical composition of black chokeberry industrial by-products. *Industrial Crops and Products*. **51**, 77-86. DOI: 10.1016/j.indcrop.2013.08.051. ISSN 09266690.
- [21] Chlorogenic acid, PubChem [online]. [cit. 2021-04-10]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chlorogenic_acid
- [22] Neochlorogenic acid, PubChem [online]. [cit. 2021-04-10]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Neochlorogenic_acid
- [23] OSZMIANSKI, JAN a JEAN C. SAPI, 1988. Anthocyanins in Fruits of Aronia Melanocarpa (Chokeberry). *Journal of Food Science*. **53**(4), 1241-1242. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1988.tb13577.x. ISSN 0022-1147.

- [24] RAZUNGLES, ALAIN, JAN OSZMIANSKI a JEAN-C. SAPIS, 1989. Determination of Carotenoids in Fruits of Rosa sp. (Rosa Canina and Rosa Rugosa) and of Chokeberry (Aronia Melanocarpa). *Journal of Food Science*. **54**(3), 774-775. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1989.tb04709.x. ISSN 0022-1147.
- [25] GRANELL, Antonio a José Luis RAMBLA, 2013. Biosynthesis of Volatile Compounds. *The Molecular Biology and Biochemistry of Fruit Ripening*. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2013-04-05, 135-161. ISBN 9781118593714. Dostupné z: DOI: 10.1002/9781118593714.ch6.
- [26] ROMANI, Annalisa, Pamela VIGNOLINI, Francesca IERI a Daniela HEIMLER, 2016. Polyphenols and Volatile Compounds in Commercial Chokeberry (Aronia Melanocarpa) Products. *Natural Product Communications*. **11**(1). ISSN 1934-578X. DOI: 10.1177/1934578X1601100129.
- [27] HIRVI, Timo a Erkki HONKANEN, 1985. Analysis of the volatile constituents of black chokeberry (Aronia melanocarpa Ell.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **36**(9), 808-810. ISSN 00225142. DOI: 10.1002/jsfa.2740360908.
- [28] BURDĚJOVÁ, Lenka, Eva VÍTOVÁ a Martin POLOVKA, 2016. Comparison of volatiles identified in Aronia melanocarpa and Amelanchier alnifolia using solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Food and Nutrition Research*. **55**(1), 57-68. ISSN 1336-8672.
- [29] Elixír z Aronie 0,2l 14,7%. *Alkohol.cz* [online]. [cit. 2021-04-15]. Dostupné z: <https://www.alkohol.cz/produkty/elixir-z-aronie-0-2l-14-7-10107/>
- [30] Aronie černý jeřáb sušený plod, superpotraviný, 2014. In: *Superpotraviný* [online]. [cit. 2021-04-15]. Dostupné z: <https://superpotraviny.webnode.cz/susene-plody/aronie-cerna/>
- [31] SIDOR, Andrzej, Agnieszka DROŹDŹYŃSKA a Anna GRAMZA-MICHAŁOWSKA, 2019. Black chokeberry (Aronia melanocarpa) and its products as potential health-promoting factors - An overview. *Trends in Food Science & Technology*. **89**, 45-60. DOI: 10.1016/j.tifs.2019.05.006. ISSN 09242244.
- [32] ŠNITA, Dalimil, 2005. *Chemické inženýrství I*. Praha: Vydavatelství VŠCHT. ISBN 80-708-0589-7.
- [33] SRIVASTAVA, Nishi, Arti SINGH, Puja KUMARI, et al., 2021. Advances in extraction technologies: isolation and purification of bioactive compounds from biological materials. *Natural Bioactive Compounds*. Elsevier, 2021, 409-433. DOI: 10.1016/B978-0-12-820655-3.00021-5. ISBN 9780128206553.
- [34] MAROUN, Richard G., Hiba N. RAJHA, Nada EL DARRA, Sally EL KANTAR, Stéphanie CHACAR, Espérance DEBS, Eugène VOROBIEV a Nicolas LOUKA, 2018. Emerging technologies for the extraction of polyphenols from natural sources. *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*. Elsevier, 2018, 265-293. ISBN 9780128135723.

- [35] OREOPOULOU, Antigoni, Dimitrios TSIMOGIANNIS a Vassiliki OREOPOULOU, 2019. Extraction of Polyphenols From Aromatic and Medicinal Plants: An Overview of the Methods and the Effect of Extraction Parameters. *Polyphenols in Plants*. Elsevier, 2019, 243-259. ISBN 9780128137680.
- [36] GRIFFITHS, H.R., 2016. Antioxidants: Characterization and Analysis. *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier, 2016, 221-226. ISBN 9780123849533.
- [37] CÖMERT, Ezgi Doğan a Vural GÖKMEN, 2020. *Physiological relevance of food antioxidants*. Elsevier, 2020, 205-250. Advances in Food and Nutrition Research. ISBN 9780128206881.
- [38] PAULOVÁ, Hana, Hana BOCHOŘÁKOVÁ a Eva TÁBORSKÁ, 2004. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické listy*. **98**, 174-179.
- [39] PRIOR, Ronald L., Xianli WU a Karen SCHAICH, 2005. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **53**(10), 4290-4302. DOI: 10.1021/jf0502698. ISSN 0021-8561.
- [40] MALTA, L.G. a R.H. LIU, 2014. Analyses of Total Phenolics, Total Flavonoids, and Total Antioxidant Activities in Foods and Dietary Supplements. *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*. Elsevier, 2014, 305-314. ISBN 9780080931395.
- [41] DENEV, Petko N., Christo G. KRATCHANOV, Milan CIZ, Antonin LOJEK a Maria G. KRATCHANOVA, 2012. Bioavailability and Antioxidant Activity of Black Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) Polyphenols: in vitro and in vivo Evidences and Possible Mechanisms of Action. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **11**(5), 471-489. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2012.00198.x. ISSN 15414337.
- [42] GALILI, Shmuel a Ran HOVAV, 2014. Determination of Polyphenols, Flavonoids, and Antioxidant Capacity in Dry Seeds. *Polyphenols in Plants*. Elsevier, 2014, 305-323. ISBN 9780123979346.
- [43] LIANG, Ningjian a David KITTS, 2014. Antioxidant Property of Coffee Components: Assessment of Methods that Define Mechanisms of Action. *Molecules*. **19**(11), 19180-19208. DOI: 10.3390/molecules191119180. ISSN 1420-3049.
- [44] SIDDEEG, Azhari, Nora M. ALKEHAYEZ, Hind A. ABU-HIAMED, Ekram A. AL-SANEA a Ammar M. AL-FARGA, 2021. Mode of action and determination of antioxidant activity in the dietary sources: An overview. *Saudi Journal of Biological Sciences*. **28**(3), 1633-1644. DOI: 10.1016/j.sjbs.2020.11.064. ISSN 1319562X.
- [45] ZHONG, Y. a F. SHAHIDI, 2015. Methods for the assessment of antioxidant activity in foods. This chapter is reproduced to a large extent from an article in press by the authors in the Journal of Functional Foods. *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*. Elsevier, 2015, 287-333. ISBN 9781782420897.
- [46] RAYESS, Youssef El, Reine BARBAR, Eli Adjélé WILSON a Jalloul BOUAJILA, 2014. *Analytical methods for wine polyphenols analysis and for their antioxidant activity evaluation*.

- [47] IQBAL, Ahmad, Aqil FARRUKH a Mohammad OWAIS, 2006. *Modern Phytomedicine: Turning Medicinal Plants to Drugs*. WILEY-VCH. ISBN 3-527-31530-6.
- [48] KALEMBA, D. a A. KUNICKA, 2003. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. *Current Medicinal Chemistry*. **10**(10), 813-829. DOI: 10.2174/0929867033457719. ISSN 09298673.
- [49] RAUDSEPP, Piret, Julia KOSKAR, Dea ANTON, et al., 2019. Antibacterial and antioxidative properties of different parts of garden rhubarb, blackcurrant, chokeberry and blue honeysuckle. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **99**(5), 2311-2320. DOI: 10.1002/jsfa.9429. ISSN 00225142.
- [50] ZAIKA, LAURA L., 1988. SPICES AND HERBS: THEIR ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND ITS DETERMINATION. *Journal of Food Safety*. **9**(2), 97-118. DOI: 10.1111/j.1745-4565.1988.tb00511.x. ISSN 01496085.
- [51] BÉNÉ, Alexandre, Antoine FORNAGE, Jean-Luc LUISIER, Peter PICHLER a Jean-Claude VILLETAZ, 2001. A new method for the rapid determination of volatile substances: the SPME-direct method. *Sensors and Actuators B: Chemical*. **72**(2), 184-187. DOI:10.1016/S0925-4005(00)00651-1. ISSN 09254005.
- [52] Solid-Phase Microextraction, 2012. RISTICEVIC, Sanja, Dajana VUCKOVIC, Heather LORD a Janusz PAWLISZYN. *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*. Elsevier, s. 420-460. ISBN 9780123813749.
- [53] STAUFFER, Eric, Julia A. DOLAN a Reta NEWMAN, 2008. Gas Chromatography and Gas Chromatography—Mass Spectrometry. *Fire Debris Analysis*. Elsevier, 2008, 235-293. ISBN 9780126639711. Dostupné z: doi:10.1016/B978-012663971-1.50012-9
- [54] CORDERO, Chiara, Cecilia CAGLIERO, Erica LIBERTO, Barbara SGORBINI, Patrizia RUBIOLO a Carlo BICCHI, 2020. Gas chromatography. *Chemical Analysis of Food*. Elsevier, 2020, 457-498. ISBN 9780128132661. DOI:10.1016/B978-0-12-813266-1.00009-7.
- [55] EMWAS, Abdul-Hamid M., Zeyad A. AL-TALLA, Yang YANG a Najeh M. KHARBATIA, 2015. Gas Chromatography—Mass Spectrometry of Biofluids and Extracts. *Metabonomics*. New York, NY: Springer New York, 2015-1-27, 91-112. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-4939-2376-2. DOI:10.1007/978-1-4939-2377-9_8.
- [56] HARVEY, David J., 2017. Gas Chromatography/Mass Spectrometry ☆. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Elsevier, 2017. ISBN 9780124095472. DOI:10.1016/B978-0-12-409547-2.14103-4.
- [57] Aronie - Černý jeřáb plod sušený. *ProdejnaBylin.cz* [online]. [cit. 2021-6-3]. Dostupné z: <https://www.prodejnabylin.cz/aronie-cerny-jerab-plod-suseny/>
- [58] SAMOTICHA, Justyna, Aneta WOJDYŁO a Krzysztof LECH, 2016. The influence of different the drying methods on chemical composition and antioxidant activity in

chokeberries. *LWT - Food Science and Technology*. **66**, 484-489. ISSN 00236438. DOI: 10.1016/j.lwt.2015.10.073.

- [59] KRAUJALYTĖ, Vilma, Erich LEITNER a Petras Rimantas VENSKUTONIS, 2013. Characterization of *Aronia melanocarpa* Volatiles by Headspace-Solid-Phase Microextraction (HS-SPME), Simultaneous Distillation/Extraction (SDE), and Gas Chromatography-Olfactometry (GC-O) Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **61**(20), 4728-4736. ISSN 0021-8561. DOI: 10.1021/jf400152x.
- [60] RODRÍGUEZ-WERNER, Miriam, Peter WINTERHALTER a Tuba ESATBEYOGLU, 2019. Phenolic Composition, Radical Scavenging Activity and an Approach for Authentication of *Aronia melanocarpa* Berries, Juice, and Pomace. *Journal of Food Science*. **84**(7), 1791-1798. ISSN 0022-1147. DOI: 10.1111/1750-3841.14660

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

FAS	Síran amonno-železitý
ppm	<i>Parts Per Million</i> ; jedna miliontina (celku)
SFE	<i>Supercritical Fluid Extraction</i> ; nadkritická fluidní extrakce
MALDI-TOF-MS	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight – Mass Spectrometry</i> ; Laserová desorpce/ionizace za účasti matrice – Detektor doby letu – Hmotnostní spektrometrie
GAE	<i>Gallic Acid Equivalent</i> ; ekvivalent kyseliny gallové
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
TEAC	<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>
DPPH	<i>2,2-DiPhenyl-1-PicrylHydrazyl radical scavenging capacity</i>
ORAC	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>
TRAP	<i>Total Radical-trapping Antioxidant Parameter</i>
TOSC	<i>Total Oxyradical Scavenging Capacity</i>
PSC	<i>Peroxyl radical Scavenging Capacity</i>
HS-SPME-GC-MS	<i>HeadSpace – Solid-Phase MicroExtraction – Gas Chromatography – Mass Spectrometry</i> ; Mikroextrakce tuhou fází – Plynová chromatografie – Hmotnostní spektrometrie

8 PŘÍLOHA

8.1 Chromatogram aromatických látek optimalizovaného extraktu; identifikace podle retenčních časů viz Tabulka 11

