VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

CHARAKTERIZACE PLODŮ BEZU ČERNÉHO

CHARACTERISATION OF ELDERBERRY FRUITS

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE Bc. SILVIA CHRISTOVOVÁ
AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE Ing. EVA VÍTOVÁ, Ph.D.
SUPERVISOR

BRNO 2014

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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	**FCH-DIP0823/2013**	Akademický rok:	**2013/2014**
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií		
Student(ka):	**Bc. Silvia Christovová**		
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)		
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)		
Vedoucí práce	**Ing. Eva Vítová, Ph.D.**		
Konzultanti:	Ing. Aleš Matějíček, Ph.D.		

Název diplomové práce:

Charakterizace plodů bezu černého

Zadání diplomové práce:

1. Zpracujte literární rešerši k dané problematice
2. Zvolte parametry vhodné pro charakterizaci nutriční a senzorické kvality plodů bezu černého
3. Vyberte metody vhodné pro jejich stanovení
4. Aplikujte je na vybrané vzorky
5. Zhodnoťte nutriční a senzorickou kvalitu plodů bezu černého

Termín odevzdání diplomové práce: 9.5.2014

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

- -	- -	- -
Bc. Silvia Christovová Student(ka)	Ing. Eva Vítová, Ph.D. Vedoucí práce	doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc. Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

- -
prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá charakterizací plodů bezu černého (*Sambucus nigra L.*) se zaměřením na aromaticky aktivní látky (AAL) a vitamin C (kyselinu askorbovou (AA) a dehydroaskorbovou (DHA)) .

Teoretická část podává stručný přehled o jeho chemickém složení, vlastnostech, léčivých účincích a možnostech zpracování. Následující kapitoly se zaměřují na AAL a vitamin C. Zmíněny jsou i metody vhodné pro jejich stanovení.

Cílem první části experimentální práce bylo stanovení aromatického profilu plodů bezu černého pomocí HS-SPME-GC-FID. Zkoumáno bylo 18 vzorků (planý bez a 17 šlechtěných odrůd). Celkem bylo identifikováno a kvantifikováno 24 různých těkavých aromaticky aktivních látek, z nich 12 alkoholů, 5 aldehydů, 4 estery, 1 kyselina a 2 „jiné“ sloučeniny (linalool a β-damascenon). Složení jednotlivých vzorků se výrazně lišilo, žádný z nich neobsahoval všechny identifikované látky.

Druhá část experimentální práce byla věnována stanovení celkového obsahu vitaminu C (součet DHA a AA) pomocí HPLC. Pro redukci DHA na AA byla zkoumána tři redukční činidla (DTT, TCEP a L-cystein) při dvou hodnotách pH (7 a 4). Nejlepší účinnost redukce byla stanovena pro TCEP při pH 4. Zvolené reakční podmínky byly aplikovány na vzorky plodů 5 vybraných odrůd. Obsah vitaminu C se pohyboval v rozmezí 5,1 – 13,0 mg na 100 g plodů.

ABSTRACT

This master's thesis deals with the characterization of elderberry fruit (*Sambucus nigra L.*) with emphasis on the aroma active compounds (AAC) and vitamin C (ascorbic acid (AA), dehydroascorbic acid (DHA)).

The theoretical part gives a brief outlook on the chemical composition and attributes of Sambucus berries, its healing properties and the means of processing. The rest of the theoretical part thoroughly examines the AAC and vitamin C. The suitable assessment methods are also discussed.

The experimental part of the work consists of two main tasks. The first one was to assess the aroma profile of Sambucus berries using the HS-SPME-GC-FID. 18 samples were examined (the wild elderberry and 17 cultivated varieties). In total, 24 different volatile aroma active compounds were identified and quantified, 12 of which belonged to alcohols, 5 to aldehydes, 4 to esters, 1 to acids and 2 “other” compounds (linalool and β-damascenone). The chemical composition of the individual samples was not uniform; no single sample contained all of the identified compounds.

The second task was to assess the total vitamin C content (the sum of DHA and AA) using the HPLC. For the purpose of reducing DHA to AA three reducing agents were examined (DTT, TCEP and L-cysteine) at two different pH levels (7 and 4). TCEP at pH 4 turned out to be most efficient and was subsequently applied on the samples of 5 selected elderberry varieties. The measured vitamin C content was within the range of 5,1 – 13,0 mg per 100 g of fruit.

KLÍČOVÁ SLOVA

bez černý, aroma, vitamin C, SPME, GC-FID, HPLC

KEYWORDS

elderberry, aroma, vitamin C, SPME, GC-FID, HPLC

CHRISTOVOVÁ, S. *Charakterizace plodů bezu černého*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 94 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Eva Vítová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Mé poděkování patří zejména Ing. Evě Vítové, Ph.D. a RNDr. Mileně Vespalcové, Ph.D. za všestrannou pomoc při zpracování této diplomové práce a dále Ing. Jitce Cetkovské a Ing. Jaromíru Pořízkovi za pomoc v laboratoři. V neposlední řadě děkuji Výzkumnému a šlechtitelskému ústavu ovocnářskému Holovousy s.r.o. za poskytnuté vzorky.

1. ÚVOD 7
2. TEORETICKÁ ČÁST 8
2.1. Bez černý (Sambucus nigra L.) 8
2.1.1. Botanický popis, charakteristika a výskyt 8
2.1.2. Vlastnosti a léčivé účinky 9
2.1.3. Technologické zpracování bezu černého 10
2.1.4. Chemické složení 11
2.2. Aromaticky aktivní látky 12
2.2.1. Vznik AAL v rostlinách 13
2.2.2. AAL v bezu černém 14
2.3. Vitamin C 16
2.3.1. Historie 16
2.3.2. Struktura 16
2.3.3. Význam v lidském organismu 17
2.3.4. Fyziologie a výživa 18
2.3.5. Využití v technologii 18
2.3.6. Faktory ovlivňující stabilitu vitaminu C v potravinách 18
2.3.7. Kyselina dehydroaskorbová 19
2.4. Metody stanovení vitaminu C 22
2.4.1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie - HPLC 23
2.4.2. Plynová chromatografie 25
2.4.3. Titrační metody 25
2.4.4. Elektrochemické metody 25
2.5. Stanovení aromaticky aktivních látek 26
2.5.1. Solid-phase microextraction (SPME) 26
2.5.2. Plynová chromatografie (GC) 26
2.6. Statistické parametry pro zpracování naměřených dat 28
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 29
3.1. Stanovení aromaticky aktivních látek pomocí SPME-GC-FID 29
3.1.1. Pracovní pomůcky a přístroje 29
3.1.2. Plyny 29
3.1.3. Standardy aromaticky aktivních látek 29
3.1.4. Reálné vzorky plodů bezu černého 31
3.1.5. Podmínky HS-SPME-GC-FID 32
3.1.6. Příprava a analýza standardů AAL 32
3.1.7. Příprava a analýza vzorků plodů bezu černého 33
3.1.8. Vyhodnocení a statistické zpracování výsledků 33
3.2. Stanovení celkového obsahu vitaminu C pomocí HPLC 33
3.2.1. Pracovní pomůcky a přístroje 33
3.2.2. Chemikálie 34
3.2.3. Reálné vzorky plodů bezu černého a rakytníku 34
3.2.4. Podmínky metody HPLC 34
3.2.5. Příprava roztoků 34
3.2.6. Analýza a redukce standardů a reálných vzorků 36

4. VÝSLEDKY A DISKUZE 38
4.1. Stanovení AAL v plodech bezu černého 38
4.1.1. Identifikace AAL 38
4.1.2. Analýza reálných vzorků 40
4.1.3. Srovnání obsahu aromatických látek v jednotlivých odrůdách bezu 47
4.1.4. Procentuální zastoupení skupin AAL ve vzorcích 51
4.2. Stanovení vitaminu C 58
4.2.1. Sestrojení kalibrační závislosti 58
4.2.2. Redukce standardních roztoků DHA na AA při pH 7 (resp. 4) 58
4.2.3. Stanovení AA v reálných vzorcích 60
4.2.4. Redukce DHA na AA v reálných vzorcích 61
5. ZÁVĚR 63
6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ 65
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK 70
8. SEZNAM PŘÍLOH 71

1. ÚVOD

Bez černý (*Sambucus nigra L.*) je rostlina, která se na území České republiky vyskytuje v hojné míře. Volně roste podél cest, polí a u potoků, do zahrad je vysazován pro svou schopnost odpuzovat některé hmyzí škůdce a hlodavce.

Zdraví prospěšné vlastnosti bezu byly známy již před staletími, v lidovém léčitelství má svoje místo dodnes. Sbírají se především květy a plody. Bezová šťáva a čaj z květů pomáhají při nachlazení, angíně a zvýšené teplotě díky svým potopudným a močopudným účinkům. Tmavě fialové až černé plody jsou bohatým zdrojem vitaminů, flavonoidů a anthokyanů, které jim dodávají antioxidační účinky. Černý bez tak celkově posiluje přirozenou obranyschopnost organismu.

Vonné a chuťové látky, které se souhrnně označují jako aromatické (nebo aromaticky aktivní), dodávají potravinám senzorické vlastnosti, díky nimž si konzument vytváří celkový dojem o surovině, potravině nebo pokrmu. Zásadním způsobem tedy ovlivňují druh a množství potravy, kterou lidé konzumují. Zastoupení jednotlivých AAL nás může informovat o stavu a kvalitě potraviny. Aromatický profil bezu je tvořen několika desítkami různých AAL, avšak za charakteristickou vůni zodpovídá jen několik málo z nich, mezi nimi např. β-damascenon a linalool.

Plody bezu černého obsahují značné množství vitaminu C, pro člověka životně důležité látky. Jelikož si jej sami neumíme v těle syntetizovat, je třeba ho přijímat v dostatečném množství potravou. Kyselina L-askorbová (AA) je hlavní biologicky aktivní formou vitaminu C. Reverzibilně je oxidována na kyselinu dehydroaskorbovou (DHA), která také vykazuje biologickou aktivitu. Její následnou oxidací vzniká již biologicky neaktivní kyselina diketogulonová. Jelikož DHA může být v lidském těle snadno redukována na AA, je nezbytné stanovit ve vzorcích obě AA i DHA, abychom zjistili celkovou aktivitu vitaminu C. Pro redukci DHA se využívají různá činidla, např. DTT a TCEP. Nejrozšířenější metodou stanovení vitaminu C je HPLC.

Teoretická část této diplomová práce podává stručný přehled o vlastnostech, léčivých účincích, možnostech zpracování v potravinářském průmyslu i domácím prostředí a chemickém složení bezu černého, zejména jeho plodů. Následující kapitoly se zaměřují na AAL – jejich vznik a výskyt v bezu, a vitamin C – jeho popis, formy, význam a využití, stabilita. Dále jsou zmíněny metody vhodné pro jejich stanovení.

První část experimentální práce se věnuje stanovení aromatického profilu vybraných odrůd bezu pomocí SPME-GC.FID. Druhá část se zabývá stanovením celkového obsahu vitaminu C. Jsou hledány optimální podmínky pro redukci DHA na AA. Srovnávána jsou tři redukční činidla při dvou různých pH. K tomuto účelu byla použita metoda HPLC.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Bez černý (Sambucus nigra L.)

2.1.1. Botanický popis, charakteristika a výskyt

Bez černý patří do čeledi zimolezovitých (*Caprifoliaceae*), někteří autoři ho řadí i do čeledí pižmovkovitých (*Adoxaceae*) a bezovitých (*Sambuceae*). Tento opadavý keř nebo stromek obvykle dorůstá výšky 3 až 5 metrů, výjimečně i 10 metrů [1, 2]. Má šedohnědou rozpukanou kůru, letorosty jsou dužnaté a sytě zelené s podlouhlými lenticelami, což jsou útvary v kůře, které zajišťují výměnu plynů mezi vnitřními rostlinnými pletivy a okolní atmosférou. Mladé větve jsou vyplněny bělavou porézní dření, často nazývanou „bezová duše“ [1, 3].

Listy jsou lichozpeřené, vstřícně uspořádané, nestejně pilovité, zašpičatělé, tmavě zelené, vespod světlejší. Raší již v dubnu [1-3].

Silně vonící květenství drobných, žlutavě bílých kvítků je ploché, chocholičnaté, známé jako tzv. kosmatice. Květy jsou oboupohlavné, mají pět tyčinek se žlutými prašníky, dvou až třípouzdrý semeník a trojdílnou bliznu. Černý bez kvete od května do července [1-4].

Zralé, sytě fialové až černé plody jsou vyplněny šťavnatou tmavě červenou dužninou. Jedná se o drobné, kulaté peckovice o průměru asi 6 mm se třemi semínky. Pro pojmenování plodů bezu černého nalezneme řadu synonym, mezi nimi např. bezinky, psí bez, smradlinky, kozičky, kobzinky, bzina a další. Dozrávají v srpnu až září [1-3, 5].

Obrázek 1: Bez černý [6]

Bez černý se vyskytuje jak v Evropě, tak Asii, na severu Afriky i v USA. V České republice rostou především tři druhy – bez černý (*Sambucus nigra*), bez chebdí (*Sambucus ebulus*) a bez červený (*Sambucus racemosa*). Obecně je známo kolem 40 druhů bezu [1, 2].

Dává přednost vlhkým půdám, snáší však i sušší podmínky. Daří se mu u potoků a v lužních lesích, často jej můžeme vidět na rumištích, v blízkosti cest i na kamenitých místech. V zahradách se těší oblibě pro svou schopnost odpuzovat některé hmyzí škůdce a hlodavce. Vyšlechtěné ozdobné odrůdy jsou vysazovány do parků [1, 2, 7].

2.1.2. Vlastnosti a léčivé účinky

Květy obsahují stopy silic, důležité flavonoidy, mezi nimi rutin, aminy, organické kyseliny, sacharidy, třísloviny, minerální látky a také rostlinný sliz, který má projímavé účinky. Pro své potopudné a močopudné vlastnosti je často podáván čaj z bezových květů při nachlazení. Uplatní se i při nemocech cév, jelikož působí na cévní stěny [1-3, 8].

Obrázek 2: Květ bezu černého[9]

Listy se využívají na zábaly kloubů při revmatických bolestech. Čaj tzv. čistí krev a pokožku, nicméně nálevy jsou kvůli nepříjemnému aroma méně používané. [1-3, 8].

Plody se často používají v lidovém léčitelství, působí jako účinné analgetikum při neuralgiích, například při bolestech trojklanného nervu, páteře a kloubů, kde se projevuje i účinek protizánětlivý, působí lehce projímavě a mírně snižují krevní tlak [3]. Ocet z plodů se používá výhradně jen k potírání a obkladům, nikoliv k ochucování pokrmů [1]. Díky bohatému obsahu na vitaminy, organické kyseliny, cukry, minerály a další látky, plody celkově posilují organismus. V nezralých plodech a listech se vyskytuje kyanogenní glykosid sambunigrin [1-3, 10, 11].

Obrázek 3: Plod bezu černého[12]

2.1.3. Technologické zpracování bezu černého

Černý bez je léčivá rostlina, která člověku nabízí mnohostranné využití jak plodů, tak i květů, listů, dokonce kůry i kořenu. Díky jejímu hojnému rozšíření v naší krajině je zpracovávána především v domácnostech, v menším měřítku v potravinářském průmyslu a využití najde také v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu [1].

Květy se zpracovávají jak čerstvé, tak i sušené. Sbírají se před úplným rozkvětem, kdy jsou ještě uzavřené se skrytými prašníky v korunce. Jídelníček je možno si zpestřit květenstvím máčeném v těstíčku a smaženém podobně jako květák. Tento pokrm je znám jako kosmatice [1]. Při sušení je vhodné je umístit na stinné místo. Skladovat je se doporučuje v nádobě z tmavého skla, dobře uzavřené, aby nevyprchal esenciální olej [1, 3]. Z květů se nejčastěji připravuje čaj. Při zánětu mandlí, dásní a nosohltanu pomáhá odvar z květů v podobě kloktadla [1].

Ze zralých plodů je možné připravit celou řadu potravinářských výrobků jako sirup, víno, povidla, kompoty, cukrářské výrobky. Přidávají se do džemů a ovocných dření, nezastupitelnou úlohu mají při výrobě likérů. Výtažky z černého bezu se přidávají do nejrůznějších nápojů, bonbónů a pochutin, černý bez je využíván jako korigens chuti a vůně [1, 3, 13].

Listy se uplatňují v homeopatii při léčbě zánětů dýchacích cest [14] a pro přípravu tinktur [3]. V lidovém léčitelství se listy používají jako zábaly proti zadržování vody v těle a při revmatismu, kdy se nemocný kloub jimi obloží.

Kůra a kořen se používají jen málo, v kombinaci s dalšími částmi bezu a jinými bylinkami především ve farmacii [1, 3].

2.1.4. Chemické složení

Obsah jednotlivých chemických látek přítomných v černém bezu se liší podle druhu, způsobu pěstování, místa výskytu, ročního období. Závisí také na úpravě jednotlivých částí rostliny po sběru, opatřeních při skladování a dalších faktorech. Důležitými látkami jsou vitaminy, glykosidy, flavonoidy, anthokyany, také fenolové kyseliny, sacharidy, organické kyseliny a minerální látky. V plodech nalezneme i řadu aromatických látek, tříslovin a další [1-3].

Energetická hodnota 100 g jedlých plodů se pohybuje kolem 73 kcal (305 kJ). Obsah nutričních látek je přibližně následující (viz tabulka 1) [15]:

Tabulka 1: Obsah nutričních látek ve 100 g jedlých plodů bezu černého[15]

Složka	Obsah (g)
Voda	79,80
Bílkoviny	0,66
Lipidy	0,50
Uhlovodíky	18,40
Vláknina	7,00
Popel	0,64

Vitaminy jsou látky organického původu, působí jako biokatalyzátory. Pro lidský organismus mají nepostradatelnou funkci. Nedostatek vitaminů může vést k vážným onemocněním. Je proto nezbytné, abychom měli zajištěn jejich pravidelný přísun v potřebném množství. Dělíme je na vitaminy rozpustné ve vodě (skupina B, C, H) a na vitaminy rozpustné v tucích (A, D, E, K). Tepelné opracování snižuje množství vitaminů v matrici, při vaření dochází k vysokým ztrátám především ve vodě rozpustných vitaminů [1, 16].

Bez černý je bohatým zdrojem vitaminu C, jak vyplývá z tabulky 2 (viz níže) [15]. Pro zachování vitaminů je třeba bezovou šťávu nenechávat příliš dlouho na vzduchu, aby nedocházelo k oxidaci. Sušené květy je třeba skladovat na suchých, tmavých místech. Více informací o vitaminu C viz kapitola 2.3.

Tabulka 2: Množství vitaminů stanovených ve 100 g jedlých plodů bezu černého [15]

Vitamin	Obsah (mg)
A (Retinol)	0,030
B1 (Thiamin)	0,070
B2 (Riboflavin)	0,060
B3 (Niacin)	0,500
B5 (Kyselina pantotenová)	0,140
B6	0,230
B9 (Kyselina listová)	0,006
C	36,000

Minerální látky jsou nezbytnou součástí organismu. Jsou důležité pro udržování homeostázy, pro činnost enzymů, hormonů, jsou součástí oporných struktur a zubů [16].

Černý bez obsahuje zejména draslík, vápník a fosfor. V jednom litru bezové šťávy je obsaženo přibližně 50 mg draslíku [1], 100 g plodů je zdrojem 38 mg vápníku a 39 mg fosforu [15]. Dalšími zastoupenými minerály jsou železo, hořčík, sodík, zinek, měď a selen [1, 15].

Sacharidy tvoří asi 10 % hmotnosti plodů. Celkový obsah sacharidů se pohybuje kolem 104,2 g na kilogram černého bezu. Nejvíce jsou zastoupeny fruktosa (cca 44 $g \cdot kg^{-1}$) a glukosa (cca 43 $g \cdot kg^{-1}$), v menším množství sacharosa (cca 1 $g \cdot kg^{-1}$). Sacharidy se během technologického zpracování mohou přidávat, proto jejich primární obsah není důležitý [17].

Organické kyseliny jsou v černém bezu obsaženy v množství přibližně 5,1 $g \cdot kg^{-1}$ plodů. Nejvíce je zastoupena kyselina citrónová (cca 3,5 $g \cdot kg^{-1}$), dále kyselina jablečná (cca 1,1 $g \cdot kg^{-1}$), v menším množství kyselina šikimová (cca 0,3 $g \cdot kg^{-1}$) a fumarová (cca 0,2 $g \cdot kg^{-1}$). Vysoké koncentrace organických kyselin jsou důležité při zpracování, neboť se do konečného produktu nepřidávají [17].

Glykosidy jsou esterové deriváty cukrů. Vznikají reakcí cukru s fenolem, aminem či alkoholem. Nejvýznamnější glykosidem v černém bezu je *sambunigrin*. Ten je obsažen jen v syrových a nezralých plodech. Za určitých podmínek je schopen tvořit kyselinu kyanovodíkovou. Testy prokázaly, že 1 litr bezové šťávy obsahuje asi 0,0001 % HCN, tedy množství, které nemůže našemu zdraví ublížit [1].

Flavonoidy jsou látky obsahující dvě fenolová jádra a kyslíkatý heterocykl. Nejvýznamnějším flavonoidem je sambucyanin, což je barvivo bezu, díky kterému můžeme zjistit, zda se jedná o čistý („pravý“) nebo „pančovaný“ bezový sirup [1]. Bylo prokázáno, že flavonoidy snižují riziko virových onemocnění a potlačují rozvoj aterosklerózy [2, 18].

Anthokyany jsou třídou flavonoidních sloučenin, které dodávají plodům bezu nápadnou tmavofialovou barvu. Stejně jako ostatní flavonoidy (např. kvercetiny), vykazují antioxidační, antikarcinogenní, imunitu stimulující, antibakteriální, antialergenní a antivirové vlastnosti. Jejich konzumace tedy může přispívat k prevenci kardiovaskulárních a zánětlivých onemocnění, rakoviny a diabetes. Anthokyany jsou známy jako lapače volných radikálů. Z tohoto důvodu jsou kultury bezu s vysokým obsahem anthokyanů považovány za velmi důležité [2, 17].

Obsah dominantních anthokyanů, kyanidin-3-glukosidu a kyanidin-3-sambubiosidu, v čerstvých plodech 13 odrůd bezu černého byl stanoven na 361 až 1266 mg na 100 g, respektive 269 až 656 mg na 100 g [18].

Tříslovinv jsou rostlinné polyfenoly rozpustné ve vodě. Vyznačují se stahujícími, dráždivými a antimikrobiálními účinky. V jednom litru bezové šťávy najdeme až 4 mg tříslovin, obsah v ostatních ovocných šťávách je asi čtyřikrát menší [1].

2.2. Aromaticky aktivní látky

Aromaticky aktivní látky (AAL) se nacházejí v různém složení a množství ve všech částech rostlin. Ve větší míře se vyskytují především v květech a plodech. Jedná se o látky nízkomolekulární (Mr < 300), málo rozpustné ve vodě, většinou nepolární nebo středně polární [19]. Fyzikálně-chemické vlastnosti významné pro jejich stanovení jsou bod varu, tlak nasycených par, tvar a rozměr molekuly a přítomnost funkčních skupin [19, 20].

Těkavé látky je možné izolovat destilací, extrakcí rozpouštědlem nebo na tuhou fázi (SPE) a headspace (statickou či dynamickou) mikroextrakcí na pevnou fázi (SPME) [20, 21].

AAL určují senzorickou neboli smyslovou jakost, což je jeden z psychických faktorů ovlivňujících značným způsobem výživu člověka. Senzorická jakost rozhoduje o druhu

a množství potravy, kterou lidé konzumují. AAL dodávají potravinám důležité senzorické vlastnosti, díky nimž si konzument vytváří celkový dojem o surovině, potravině nebo pokrmu. Primární AAL jsou látky původně přítomné v potravině, sekundární vznikají v potravině v průběhu skladování, zpracování atd. Přestože potraviny obsahují i tisíce různých vonných látek, na výsledné specifické vůni se většinou podílí jen několik málo z nich [22].

Hodnoty dolního podnětového prahu, tedy nejnižší postřehnutelné koncentrace, a prahu rozpoznání, což je nejnižší koncentrace látky, při které lze určit charakter (kvalita) vůně nebo chuti, jsou závislé na prostředí (vzduch, voda, jiné) a pro každou látku se liší. Rozdíly mezi látkami se pohybují v rozmezí i několika řádů (viz tabulka 3) [19]. Jelikož není zcela znám mechanismus odpovědný za vnímání rozdílných podnětových prahů, tyto meze nemohou být prozatím stanoveny pouze přístroji, a jsou proto určovány na základě rozsáhlých testů s lidskými subjekty v laboratorním prostředí. Nejčastěji používanou metodou je plynová chromatografie ve spojení s olfaktometrií (GC-O) [21, 23].

Tabulka 3: Příklady hodnot podnětového prahu látek ve vodném roztoku [19]

Látka	**Koncentrace [mg·l^{-1}]**
Ethanol	100
Malinový keton	0,01
Linalool	0,006
Isobutyraldehyd	0,001
Methanthiol	0,00002
2-isobutyl-3-methoxypyrazin	0,000002

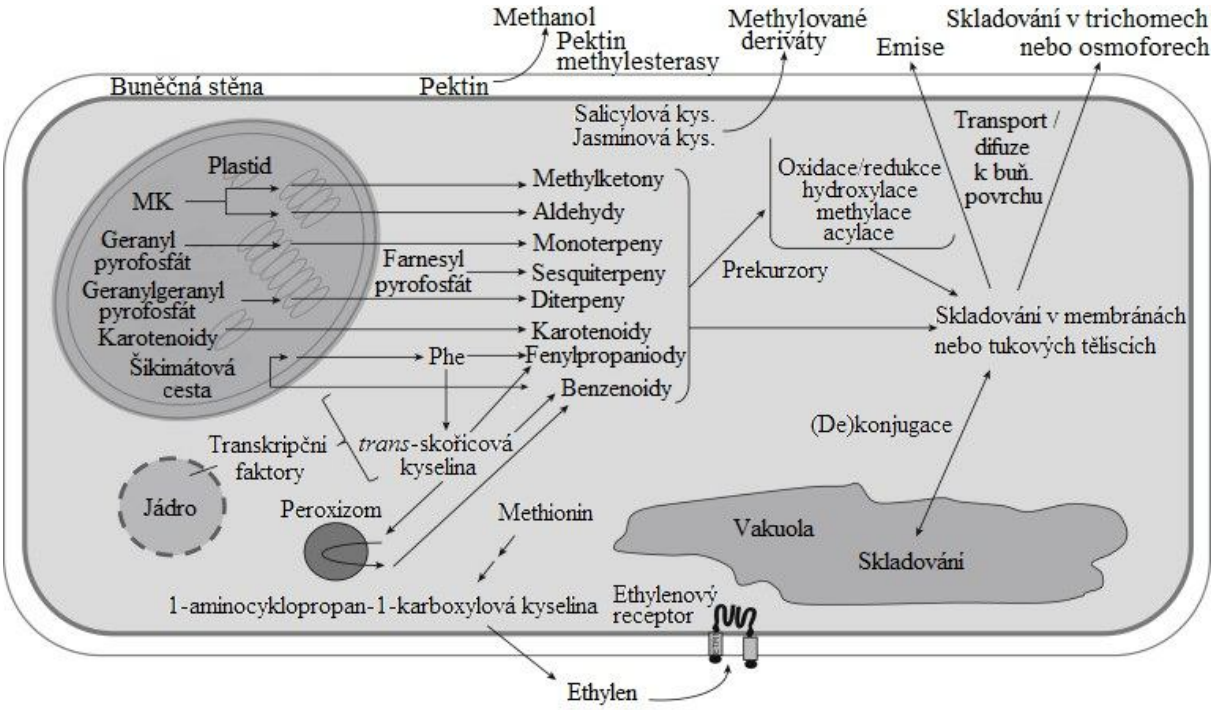
2.2.1. Vznik AAL v rostlinách

Složky, které mají tendenci být lipofilní, jsou často syntetizovány z hydrofilních prekurzorů, jejichž hydrofilní funkční skupiny byly odstraněny nebo maskovány redukčními, methylačními nebo acylačními reakcemi. Dokonce i těžké kovy (např. rtuť a selen) mohou být převedeny na těkavé deriváty. Genové analýzy genových rodin zprostředkovávajících tyto reakce ukázaly, že mnohé z nich prošly cyklem genové duplikace s modifikací na několika kritických residuích. Tyto modifikace měly za následek změnu substrátové specifity enzymu. Jejich lipofilita umožňuje těkavým látkám prostoupit membránou a uvolnit se do atmosféry.

Mnoho různých metabolických drah přispívá k tvorbě AAL, a tudíž celkový obsah a složení uvolněných látek poskytuje informace o metabolickém stavu rostliny.

Většina aromatických látek v rostlinách je odvozena ze čtyř tříd – terpenoidů, mastných kyselin, látek s aromatickým kruhem a aminokyselin jiných než fenylalanin. Aromatické sloučeniny odvozené od fenylalaninu nacházející se v lístcích květů zahrnují sloučeniny vzniklé zkrácením řetězce trans-skořicové kyseliny, viz obrázek 4.

Terpenoidy hrají hlavní roli při vytváření chemické rozmanitosti rostlinných těkavých látek. Z jedno- a dvouuhlíkatých AAL jsou nejčastěji uvolňovány methanol a ethylen. Methanol vzniká demethylací pektinu, přítomného v hojné míře v buněčné stěně, když listy mění svůj tvar během růstu nebo při odumírání. Ethylen je jeden z rostlinných hormonů uvolňovaných do atmosféry v biologicky aktivním množství. Vzniká oxidačním procesem z 1-aminocyklopropan-1-karboxylové kyseliny (viz obrázek 4), která je odvozena z aminokyseliny methioninu [24].



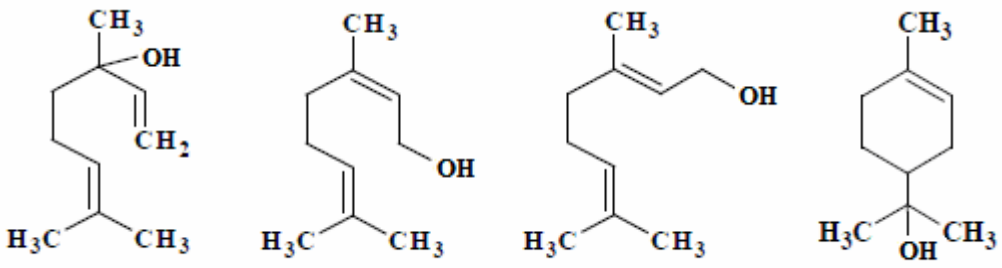
Obrázek 4: Biosyntetický původ rostlinných těkavých látek (AAL) (upraveno) [24]

2.2.2. AAL v bezu černém

Terpenové uhlovodíky a především jejich kyslíkaté deriváty tvoří významnou složku aroma téměř všech druhů ovoce, zeleniny a koření. V plodech i květech bezu černého byly identifikovány různými autory monoterpenoidní alkoholy a oxidy, např. rose oxid, nerol oxid, linalool, hotrienol, α-terpineol (viz obrázek 5). Některé z nich však mohly vzniknout až v průběhu extrakce kyselou nebo enzymatickou hydrolýzou monoterpenových polyolů odvozených z epoxidů nebo glykosidů [25-28]. Terpenové alkoholy mají většinou sladké, těžké, květinové aroma [22].

Z bezkyslíkatých terpenů byly v bezu identifikovány např. myrcen, terpinolen, β-pinen [25], limonen [25, 27] nebo také α-felandren a (E)-β-ocimen [28].

Z alkoholů se jako aromatické látky uplatňují hlavně nižší primární alkoholy (do 18 C; methanol, ethanol) a jejich estery [22]. Ve šťávě z černého bezu byly nalezeny 2-methyl-1-butanol a 3-methyl-1-butanol (isoamylalkohol), které tvoří neseparovatelnou směs a bývají tedy vyhodnocovány kvantitativně i statisticky jako jedna látka [25-27]. Nejpravděpodobněji jsou tvořeny z aminokyselin (Ile, Leu) [25, 29]. V extraktu z květin tvořily značný podíl (Z)-3-hexen-1-ol a 1-hexanol [28].



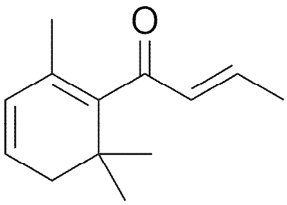
Obrázek 5: (Zleva) linalool, nerol, geraniol, α –terpineol [22]

Těkavé karbonylové sloučeniny patří k nejdůležitějším vonným a chuťovým látkám. Většina z nich je spojována se zelenou a/nebo ovocnou vůní [28]. Jejich prekurzory jsou aminokyseliny, polynenasycené mastné kyseliny v lipidech i sacharidy. Z aminokyselin vznikají aldehydy jako sekundární produkty alkoholového či mléčného kvašení a při termických procesech Streckerovou degradací [22]. V extraktu z květin byly nalezeny hexanal, heptanal a pentanal, z ketonů pak 3-hydroxy-2-butanon [28]. Nonanal byl spojován s charakteristickou bezovou vůní při analýze bezové šťávy [26].

Zástupcem aromatických aldehydů je benzaldehyd. Najdeme ho volný i vázaný v některých kyanogenních glykosidech (v hořkomandlové silici, skořicové silici) [22]. Byl stanoven jak v plodech, tak i květech bezu [25-28, 30], kde byl spojován se sladkým aroma [27, 28].

Ketony v potravinách mívají 3-17 C, jejich prahové koncentrace jsou vyšší než u aldehydů, jelikož jsou méně reaktivní. Alifatické ketony s krátkým uhlíkatým řetězcem mají většinou příjemnou vůni. Nežádoucí aroma mají nenasycené ketony, např. 1-penten-3-on, který zapáchá po rybím tuku. Nejčastěji se vyskytujícím ketonem je aceton, který je metabolitem mnoha mikroorganismů [22].

Terpenický keton β-damascenon (viz obrázek 6) byl identifikován jako hlavní složka přispívající k charakteristické bezové vůni [25-28]. Pravděpodobně se jedná o derivát karotenoidů [25, 28].



Obrázek 6: β –damascenon [22]

Ve studii Jensena a kol. [26] byly stanoveny a vzájemně porovnány aromatické profily šťáv z plodů sedmi odrůd bezu černého. Charakteristické bezové aroma bylo dáno β-damascenonem a dihydroedulanem. Skupina ovocných tónů zahrnovala alifatické alkoholy, aldehydy a aromatické estery, jako 1-pentanal, 2-methyl-1-propanol, 2- a 3-methyl-1-butanol, 1-oktanal, 1-oktanol a methyl- a ethylbenzoát. Květinové aroma typické pro bezový květ bylo spojováno s látkami jako 1-nonanal, nerol oxid a rose oxid, kdežto květinové tóny odlišné od bezových byly dány hotrienolem, linaloolem a α-terpineolem. Svěží a travnaté vůně korespondovaly s 1-hexanalem, (E)-2-hexen-1-alem, (Z)-3-hexen-1-olem, (E)-2-hexen-1-olem a (E)-2-okten-1-alem. S houbovým pachem byly spojovány 1-okten-3-ol a 1-okten-3-on [26].

Olfaktometrická analýza sirupu z bezových květů byla provedena Jorgensenem a kol. [27] pro pět odrůd. Aromatický profil se z velké části shodoval s výše uvedeným [26].

Další studie Toulemonde a Richarda [30] se zabývala těkavými látkami v sušených květech bezu černého. Tři různé extrakty byly analyzovány: esenciální olej získaný destilací vodní parou, ethanolový koncentrát extraktu získaného petrolejovým etherem a isopentanový extrakt z ethanolového koncentrátu. Pomocí GC, IR a MS bylo identifikováno 79 sloučenin, mezi nimi opět linalool, cis-hexenol, cis- a trans-rose oxid a β-damascenon.

Různými autory již bylo v bezových produktech identifikováno více než 100 těkavých AAL, mezi nimi alifatické alkoholy, aldehydy, ketony, estery, furany, terpenoidy a deriváty kyseliny šikimové, avšak jejich výsledky se shodují jen z části. Rozdíly mohou být způsobeny tím, že jednotlivé odrůdy byly pěstovány a analyzovány za odlišných podmínek, případně tím, že byly použity různé extrakční postupy při izolaci AAL [28].

2.3. Vitamin C

2.3.1. Historie

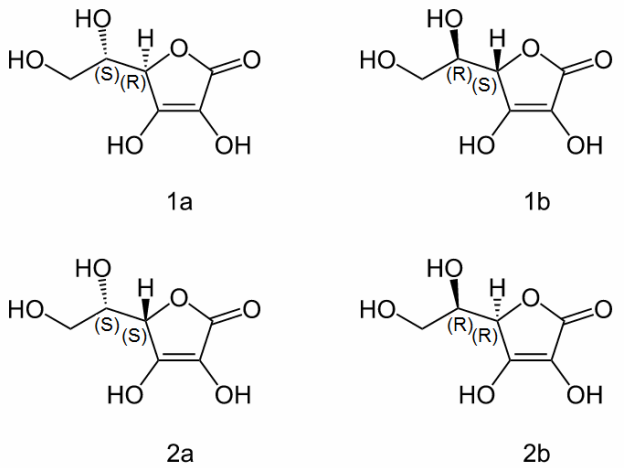
Poprvé byl vitamin C izolován v roce 1928 maďarským biochemikem Albertem Szent-Györgyim. Tehdy neznámou krystalickou látku získanou z pomerančů při výzkumu biologické oxidace nazval „ignóza“, posléze ji přejmenoval na „hexuronovou kyselinu“. Stanovení přesné chemické struktury a získání vitaminu syntetickou cestou se podařilo až siru Walterovi N. Haworthovi z Birminghamské univerzity. Látka byla tedy následně přejmenována na kyselinu askorbovou, jelikož působila proti skorbutu. Oba vědci byli za svůj přínos oceněni Nobelovou cenou v roce 1937 [31].

2.3.2. Struktura

Vitamin C neboli kyselina askorbová se řadí strukturou mezi deriváty sacharidů – kyseliny [32]. Kyselina askorbová, anglicky ascorbic acid (AA), CAS 50-81-7, je bílá až nažloutlá krystalická látka, ve vodě rozpustná, s pH 2 – 3, bez zápachu. Je citlivá na teplo a kyslík. Její sumární vzorec je $C_6H_8O_6$ [33].

Kyselina askorbová se vyskytuje ve čtyřech formách – stereoizomerech (viz obrázek 7), avšak biologicky aktivní je jen kyselina L-askorbová (γ-lakton L-threo-hex-2-enové kyseliny). Ostatní formy, tedy kyselina D-askorbová a druhý pár enantiomerů, L- a D-isoaskorbová kyselina, aktivitu vitaminu C nevykazují.

Silné redukční účinky jsou dány endiolovým uspořádáním na atomech C2 a C3. Vitaminem C se rozumí celý reversibilní redoxní systém: kyselina L-askorbová, L-askorbylradikál a dehydroaskorbová kyselina (DHA) [35].

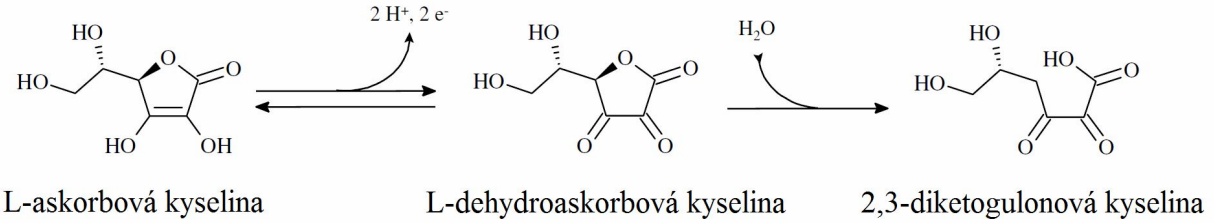


Obrázek 7: Stereoizomery kyseliny askorbové: L-askorbová kyselina (1a); D-askorbová kyselina (1b); L-isoaskorbová kyselina (2a); D-isoaskorbová kyselina (2b) [34]

Oxidace AA na DHA (biologicky též aktivní) poskytuje dva atomy vodíku, které mohou být využity při biologicky významných redukčních procesech. Tato reakce je reverzibilní.

Při fyziologickém pH je DHA velmi rychle hydrolyzována na již biologicky neaktivní diketogulonovou kyselinu, jak je zobrazeno na obrázku 8 [36, 37]. Zda je hydrolýza DHA in vivo zcela ireverzibilní či alespoň částečně reverzibilní není prozatím s jistotou stanoveno.

Za podmínek oxidačního stresu je diketogulonát degradován na 5- a 4-uhlíkaté spécie. In vitro dochází k sledu (ireverzibilních) α-dekarboxylací vedoucích k threonátu. Ten je v oxidativním prostředí celkem stabilní. V biologických systémech může být diketogulonát dekarboxylován a redukován na další sloučeniny jako kyselina lyxonová, xylonová a xylosa [36].



Obrázek 8: Oxidace kyseliny L-askorbové [37]

2.3.3. Význam v lidském organismu

Hlavní složkou vitaminu C je kyselina L-askorbová, která v lidském těle plní mnoho životně důležitých funkcí. Podílí se na tvorbě červených krvinek, má vliv na absorpci iontových forem železa a jeho transportu, stimuluje transport sodných a chloridových iontů, účastní se biosyntézy mukopolysacharidů a prostaglandinů, uplatňuje se v metabolismu cholesterolu. Svou úlohu hraje i při hydroxylačních reakcích, jakými jsou např. rozklad tyrosinu, vznik noradrenalinu, biosyntéza karnitinu a hydroxylace prolinu a lysinu v prokolagenu [35, 38]. Antioxidační účinky jsou dány reakcemi s aktivními formami kyslíku a oxidovanými formami vitaminu E. Tyto rekce zabezpečují ochranu vitaminu E a lipidů membrán před oxidací. Vitamin C inhibuje tvorbu nitrosaminů a je významnou antikarcinogenní a antimutagenní látkou [35].

2.3.4. Fyziologie a výživa

Lidské tělo není schopno samo vytvářet vitamin C, proto je nutné ho přijímat potravou. Zdroji bohatými na vitamin C jsou především ovoce (citrusové a tropické plody), zelenina (kapusta, brokolice) a také např. šípek či rakytník. Vlivem zpracování potravin však dochází k úbytku vitaminu C až o 80 %. Nejšetrnějším způsobem úpravy je dušení v páře. Velké ztráty jsou způsobeny vařením, sušením, tepelnou konzervací a blanšírováním.

Doporučovaný denní příjem vitaminu C se pohybuje kolem 60 až 200 mg [35]. Jeho hladina v plazmě a tělesných tkáních je zcela závislá na perorálním příjmu, jelikož se zásoby vitaminu C v těle nevytváří (až na nadledviny) [39]. Nedostatek vitaminu C (hypovitaminosa) se projevuje nejčastěji únavou, ztrátou chuti k jídlu a oslabením imunitního systému. Při dlouhodobém nedostatku (avitaminose) je organismus ohrožen skorbutem neboli kurdějemi, se kterými se ale v dnešní době již nesetkáváme.

Kyselina askorbová je absorbována v trávícím traktu skrze aktivní přenašečový transport. Je přeměněna na dehydroaskorbovou kyselinu, která je přes buněčnou membránu přepravena rychleji a v buňkách epitelu se znovu redukuje na kyselinu askorbovou.

Řada oxidoreduktas je považována za antivitamin C. Patří mezi ně např. askorbátoxidasa, askorbátperoxidasa, dehydroxyaskorbátreduktasa a superoxiddismutasa [35].

2.3.5. Využití v technologii

Díky redukčním a antioxidačním účinkům jsou kyseliny L-askorbová a L-isoaskorbová využívány v potravinářském průmyslu. Kyselina D-askorbová nemá žádnou nutriční hodnotu, proto se jako potravinářská surovina nevyužívá.

Kyselina askorbová se pod označením E 300 aplikuje jako potravinářské aditivum v konzervárenské a kvasné technologii, přidává se k ovocným džusům, mrazírensky skladovanému ovoci, používá se jako inhibitor reakcí enzymového hnědnutí při loupání, krájení a sušení ovoce, zeleniny a brambor. Dále zlepšuje pekařské vlastnosti mouky, v pivovarnictví se využívá jako prevence tvorby chladových a oxidačních zákalů, v technologii výroby vína je možné díky ní snížit množství přidávaného oxidu siřičitého, pomáhá zachovat barvu zpracovaného masa [35].

Jako potravinářská aditiva se využívají i soli kyseliny askorbové. Askorbát sodný (E 301) a askorbát vápenatý (E302) se uplatňují při nakládání masa, kde inhibují tvorbu nitrosaminů. Pod označením E 304 nalezneme estery mastných kyselin s kyselinou askorbovou, askorbylpalmitát a askorbylstearát, které jsou rozpustné v tucích [40].

2.3.6. Faktory ovlivňující stabilitu vitaminu C v potravinách

Jak již bylo zmíněno, kyselina askorbová se snadno oxiduje a tím se snižuje její obsah v potravinách. Rychlost oxidace je dána skladovacími podmínkami. Významným zdrojem vitaminu C jsou ovocné džusy, jejichž konzumace v posledních letech prudce vzrostla a i nadále stoupá. Proto se mnohé studie zabývají nejen samotným stanovením obsahu AA, ale i problematikou ztráty vitaminu C v závislosti na době uchování a na různých skladovacích podmínkách (teplotě, koncentraci kyslíku, obalového materiálu) [41-44].

Informace o správném skladování nejen džusů, ale i dalších produktů, jsou velice důležité a užitečné pro spotřebitele, kteří by měli vědět, jak s potravinami zacházet, aby zabránili ztrátě zdraví prospěšných látek co nejvíce.

Ve studii Kabakalise [41] bylo zjištěno, že v komerčně dostupných džusech skladovaných v uzavřených obalech při pokojové teplotě došlo po 4 měsících ke ztrátě kyseliny askorbové v rozmezí 29 – 41 %. V případě, kdy byly nádoby otevřeny pro konzumaci a následně skladovány v lednici, ztráta AA činila po 31 dnech 60 – 67 % u komerčně dostupných džusů, ale jen 7 – 13 % u čerstvě vymačkané šťávy [41].

Chuť je jedním z atributů senzorické kvality. Společně s barvou a vůní určují výběr potraviny konzumentem. Citrusové plody obsahují látky, které způsobují hořkou nebo adstringentní chuť (např. limonin, naringin, neohesperidin), která je konzumenty odmítána. To je důvod, kvůli kterému je prováděn tzv. „debittering“, což je proces, při kterém se snižuje množství látek způsobujících vnímání těchto chutí. Během úpravy však dochází ke značným ztrátám jak vitaminu C (26 %), tak i dalších významných látek, např. kyseliny hydroxyskořicové (32 %), flavonů (28 %) a flavanonů (41 %). Antioxidační kapacita těchto džusů bývá také mnohonásobně nižší [45].

Největší vliv na stabilitu vitaminu C má kyslík a tedy (nepřímo) i typ balicího materiálu. Vyšší stabilita vitaminu C byla prokázána u ovocných džusů skladovaných ve skleněných lahvích než v nádobách vyrobených z polymerů jako polyethylen (PE) a polystyren (PS) nebo z kartonových krabic, což je dáno vysokou permeabilitou těchto materiálů pro kyslík.

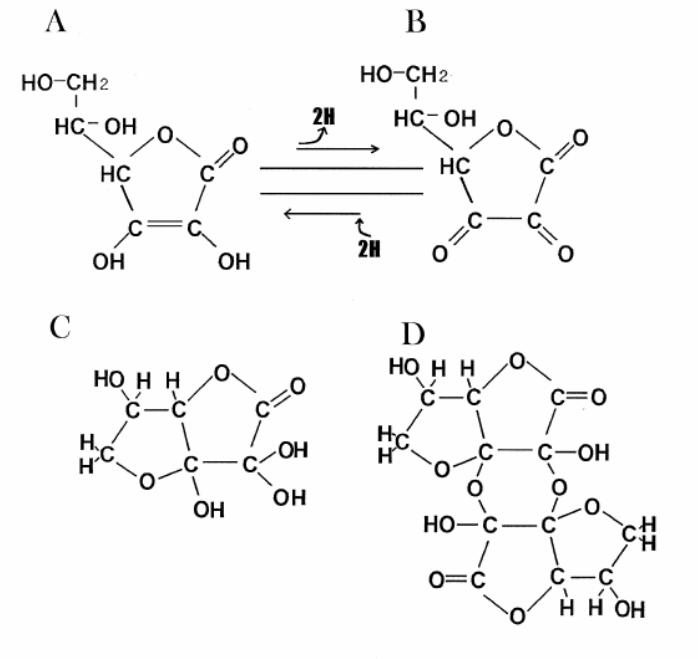
Pro maximální snížení ztrát vitaminu C a udržení co nejnižšího s ním spojeného neenzymatického hnědnutí je třeba udržovat nízkou koncentraci kyslíku jak rozpuštěného, tak i v prostoru nad potravinou [43].

2.3.7. Kyselina dehydroaskorbová

Dehydroaskorbová kyselina, anglicky dehydroascorbic acid (DHA), CAS 490-83-5, je béžová až dohněda zbarvená látka v práškové formě, bez zápachu. Její sumární vzorec je $C_6H_60_6$ [46]. Jedná se o reverzibilně oxidovanou formu kyseliny askorbové (viz obrázek 9 A, B), obě formy jsou významnými složkami potravin. DHA se ve vodě vyskytuje převážně ve formě hydratovaného hemiacetalu (viz obrázek 9 C), kdežto v krystalickém stavu tvoří dimer (viz obrázek 9 D).

Tvorba DHA z AA je v dnešní době považována za nejdůležitější reakci, které AA podléhá a souvisí s mnoha jejími známými chemickými vlastnostmi a fyziologickou aktivitou. Posledních několik desítek let byla DHA považována za spíše jen oxidační produkt AA nežli za látku s vlastními významnými chemickými a biologickými charakteristikami.

Přestože mají obě, DHA i AA, antiskorbutní účinky, DHA se v některých ohledech liší. DHA je reaktivnější a nestabilnější v roztocích, může být redukována na AA nebo rovnou hydrolyzována a oxidována, což ji činí jak oxidačním, tak i redukčním činidlem. V buněčných systémech plní DHA jiné biologické role než AA [36].



Obrázek 9: Reverzibilní reakce mezi kyselinou askorbovou (A) a dehydroaskorbovou (B). Hydratovaný hemiacetal DHA (C) a krystalická struktura dimerního DHA (D). [36]

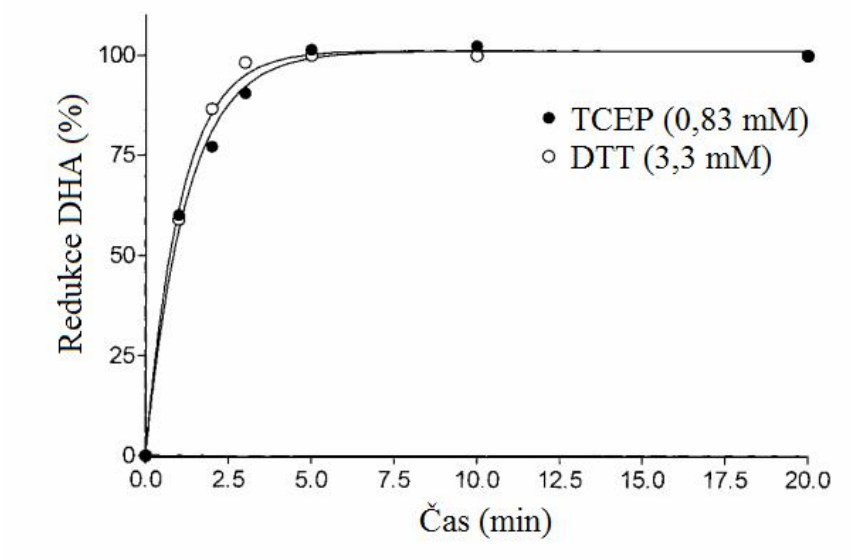
2.3.7.1. Metody pro oxidaci AA na DHA

DHA je možno připravit různými oxidačními technikami s použitím halogenů, peroxidu vodíku, chloridu železitého a dalších činidel. Jedna z běžných metod užívá bromovou vodu. Někdy je uplatňována askorbát oxidasa. Existují různé výhody a nevýhody daných systémů, avšak jednoduchost použití bromové vody činí tento postup preferovaným v případech, kdy ho lze aplikovat [36].

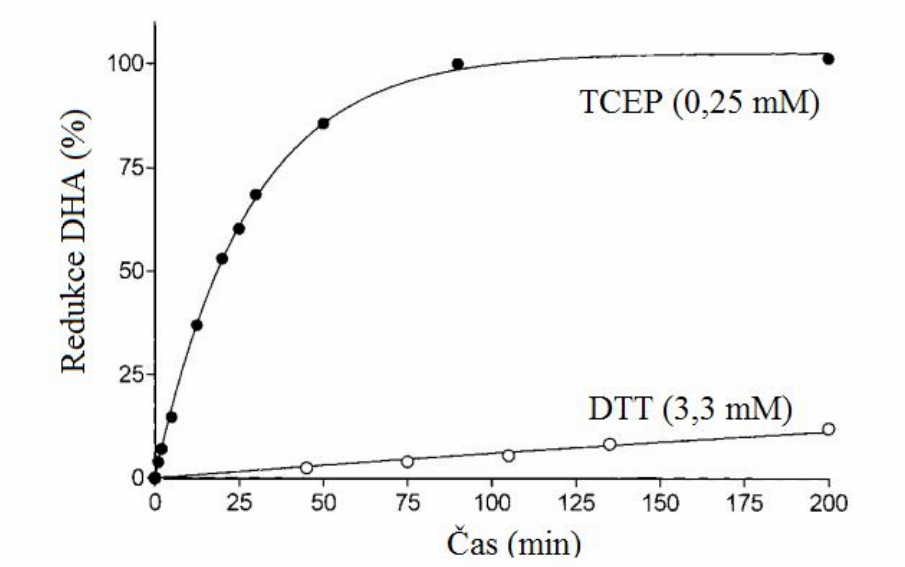
2.3.7.2. Metody pro redukci DHA na AA

Thiol-obsahující sloučeniny snadno převádí DHA na AA. Ve studiích in vitro byla aplikována řada sulfhydrylových sloučenin jako například homocystein [18], dimerkaptopropanol, merkaptoethanol, glutathion a dithiothreitol (DTT) [36, 47, 48] nebo sloučeniny na bázi fosforu jako tris-(2-karboxyethyl)fosfin (TCEP) [47, 49].

Výsledky studií ukazují, že účinnost redukčních činidel DTT a TCEP je při neutrálním pH téměř shodná (viz graf 1). Avšak při nižším pH (kolem 4) poskytuje TCEP mnohonásobně vyšší efektivitu redukce v porovnání s DTT (viz graf 2). Navíc, zatímco DTT je schopno udržet redukční prostředí ve vzorku jen méně než 24 hodin, TCEP zajišťuje kompletní ochranu před zpětnou oxidací AA po dobu nejméně 96 hodin po přípravě vzorku [49].



Graf 1: Redukce DHA na AA pomocí TCEP a DTT při pH 6,2 [49]



Graf 2: Redukce DHA na AA pomocí TCEP a DTT při pH 4,3 [49]

In vivo je DHA transportována do buněk a okamžitě redukována na AA řadou enzymatických procesů, které uplatňují glutathion, NADH nebo NADPH jako redukční činidlo [36].

2.3.7.3. Antioxidační vlastnosti DHA

Přestože je AA více redukovanou formou v AA:DHA systému, zdá se, že DHA vykazuje vlastní antioxidační vlastnosti. Bylo například zjištěno, že DHA lépe chrání nízkohustotní lipoproteiny (LDL) před oxidací způsobenou měďnatými ionty. Některé studie poukazují na to, že existují reakce probíhající in vivo i in vitro, které nejsou doposud dostatečně popsány, ale mohly by mít velký význam pro celkový redoxní stav v živých organismech [36].

2.3.7.4. Analytické stanovení DHA

Nejrůznější techniky byly použity pro studium struktury a chemických vlastností DHA a mnohé z nich jsou stále v dnešní době aplikovány. Krystalografické studie ukázaly, že molekulární struktura DHA je na rozdíl od AA dimerní po vykrystalizování z nevodného prostředí (viz výše obrázek 9 D).

Pro získání dalších informací o DHA i AA byla použita ^{13}C nukleární magnetická rezonance (NMR), hmotnostní spektrometrie (MS), infračervená spektroskopie a měření v oblasti UV. DHA roztoky dobře absorbují UV světlo při 185 nm a mírně také nad 220 nm, kdežto AA silně absorbuje při 265 nm. Dále se uplatňují elektrochemické metody (coulometrie, amperometrie) a separační chromatografické metody (HPLC, GC) [36].

Nutnost použití nepřímých metod pro stanovení DHA je dána faktem, že v současné době neexistuje žádná přímá metoda, která by byla dostatečně citlivá [49]. Koncentrace DHA je běžně stanovována výpočtem jako rozdíl koncentrace AA po a před redukcí [47].

Někteří autoři se domnívají, že DHA se nekumuluje v rostlinných buňkách a že tedy její identifikace v daných matricích je způsobena tvorbou DHA v průběhu manipulace se vzorkem [36].

2.4. Metody stanovení vitaminu C

Výběr vhodné analytické metody je rozhodující pro získání co nejpřesnějších výsledků. Jelikož celkové množství vitaminu C (součet AA a DHA) slouží jako ukazatel kvality potraviny spojený s prospěšností pro zdraví, roste zájem o simultánní stanovení těchto dvou kyselin. Během analýz narážíme na problémy, jako např. selektivita a citlivost metody, výběr vnitřního standardu pro kvantifikační účely, retence AA a DHA v HPLC systému, výběr vhodného detektoru a stabilita AA a DHA v roztocích [50]. Ke stanovení celkového vitaminu C se většinou používá konverze kyseliny dehydroaskorbové na kyselinu askorbovou pomocí vhodných redukčních činidel (viz kapitola 2.3.7.2.) [32].

V literatuře bylo popsáno mnoho analytických metod ke stanovení obsahu kyseliny askorbové v potravinách a biologických materiálech, mezi nimi spektrofotometrie, fluorimetrie, celá řada nespektrofotometrických metod jako titrace, chemiluminiscence, kapilární zónová elektroforéza, plynová chromatografie. Jiné metody jsou založeny na elektrochemické detekci, např. potenciometrie, polarografie, coulometrie, voltametrie.

V běžné praxi se však ujaly jen některé. Patří mezi ně chromatografické metody, především HPLC. Na rozdíl od ostatních metod totiž obvykle nepotřebuje derivatizaci a poskytuje vyšší selektivitu než spektrofotometrické, titrační či enzymatické metody. U těchto metod dříve docházelo k interferenci analytů například s cukry, ionty železa a mědi nebo peroxidu vodíku.

HPLC metody jsou obecně citlivější, záleží však na použitém detekčním systému. Nejčastěji jsou používány UV a elektrochemická detekce, zřídka pak hmotnostní spektrometrie (MS) především kvůli vysoké ceně provozu přístroje a fluorescenční detekce (FD) kvůli nutnosti derivatizace DHA, pokud vzorek sám neemituje fluorescenční záření, a doplňkové oxidaci AA na DHA. Metody vnitřních standardů nejsou časté, přestože by bylo vhodné je používat, jelikož vitamin C se často stanovuje v komplexních matricích (potraviny a biologické tekutiny), u nichž dochází k složité přípravě vzorků [50].

Stanovením obsahu vitaminu C v plodech 13 odrůd bezu černého se ve své práci zabývali např. Kaack a Austed [18], byly naměřeny hodnoty v rozsahu 6 - 25 mg/100 g.

2.4.1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie - HPLC

HPLC, odvozeno od anglického názvu High Performance Liquid Chromatography (přípustný název je i High Pressure Liquid Chromatography), disponuje výkonným vysokotlakým čerpadlem, které umožňuje průtok mobilní fáze kolonou menších rozměrů, v níž je stacionární fáze vázaná na částice o velikosti jen několik mikrometrů. Díky tomuto systému dosahuje HPLC vyšší účinnosti separace látek za kratší dobu ve srovnání s klasickou sloupcovou chromatografií [51, 51].

Dle polarity fází rozlišujeme dva typy HPLC [51, 52]:

- normální (Normal Phase HPLC, NP-HPLC) - stacionární fáze je polárnější než fáze mobilní.
- reversní (Reverse Phase HPLC, RP-HPLC) - stacionární fáze je méně polární než fáze mobilní, tato technika je používána mnohem častěji. Mobilní fází může být např. voda, methanol, acetonitril a jejich směsi v různých vzájemných poměrech, pufry a další.

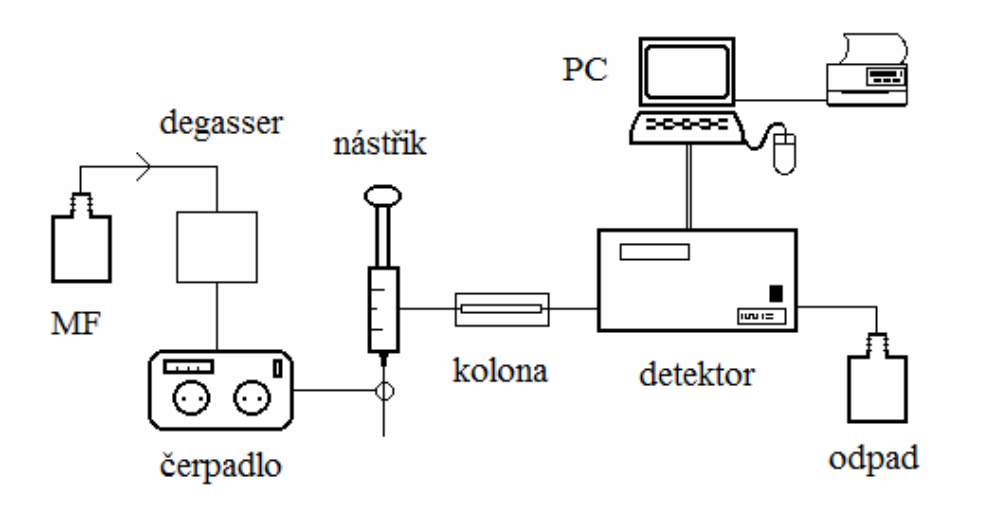
AA a DHA patří do skupiny polárních molekul velmi malých rozměrů, které je obtížné zadržet v konvenčním RP-HPLC systému a oddělit od mrtvého objemu. Tento fakt je důležitý zejména v bioanalytických stanoveních, při kterých jsou balastní látky z matrice eluovány s mrtvým objemem nebo na začátku chromatogramu [50].

Dobrých výsledků bylo v poslední době dosaženo i metodou HILIC (hydrofilní interakční chromatografie) [50, 54]. Výhodou HILIC je možnost využití velkého množství organického rozpouštědla, které umožňuje spojení LC s MS detekcí, a zajištění vysoké citlivosti [50].

2.4.1.1. Části kapalinového chromatografu [51, 52]

- Zásobní lahve s mobilní fází
- Degasser - zařízení pro odplynění mobilní fáze.
- Vysokotlaké čerpadlo (pumpa)
- Směšovač mobilních fází – využívá se při gradientové eluci.
- Zařízení pro dávkování vzorku (dávkovač, autosampler) - běžně se používají ventily s dávkovací smyčkou definovaného objemu.
- Chromatografická kolona
- Termostat kolony - slouží k udržení konstantní teploty po dobu analýzy.
- Detektor - v experimentální části této práce byl použit UV detektor.
- PC (osobní počítač) - zaznamenává a uchovává signály přijímané z detektoru.
- Sběrná nádoba na odpad - ústí do ní vývod z kolony.

Pomocí vysokotlaké pumpy je ze zásobních lahví vedena mobilní fáze přes degasser do kolony, z ní do detektoru a poté do odpadu. Ručně či automaticky je dávkován vzorek (řádově µl) do proudu mobilní fáze, která ho unáší do kolony. Zde dochází k separaci jednotlivých složek. Výstup z kolony vede do detektoru, kde dochází k detekci. Signál z detektoru je zaznamenán pomocí počítače a zpracován v podobě chromatogramu. Schéma kapalinového chromatografu je vyobrazeno na obrázku 10 [51, 52].



Obrázek 10: Schéma kapalinového chromatografu (MF – mobilní fáze)

Během gradientové eluce se poměr jednotlivých mobilních fází během analýzy mění. Podle předem zvoleného programu se míchají ve směšovači mobilní fáze (většinou jen dvě, ale je možné jich namíchat i více) o různém složení. Díky tomu je umožněna rychlá eluce složek silněji zadržených v koloně a jejich píky v chromatogramu jsou potom užší a ostřejší oproti izokratické separaci. Nevýhodou je tzv. drift základní linie, čas nezbytný na ekvilibraci kolony na počáteční složení mobilní fáze a možnost použití jen určitých typů detektorů.

Při izokratické eluci je složení mobilní fáze během celé analýzy konstantní, lze tedy pracovat s předem namíchanou odplyněnou mobilní fází a směšovač v tomto případě není zapotřebí. V experimentální části této práce je použita právě izokratická eluce.

Chromatografická kolona je nejdůležitější součástí přístroje. Jedná se o trubici s vnitřním průměrem v řádu několika milimetrů a délky kolem 5 až 25 cm. Nejpoužívanější materiál pro výrobu kolon je nerezová ocel, sklo a plast (PEEK – polyetheretherketon). Kolona je naplněná stacionární fází, obvykle chemicky modifikovaným oxidem křemičitým. Běžně jsou navázány uhlovodíkové funkční skupiny jako C8 (oktyl) a C18 (oktadecyl).

Na začátku kolony je tzv. předkolona, sloužící jako filtr pro ochranu samotné kolony.

Spektrofotometrický detektor (UV-VIS) patří k nejpoužívanějším v HPLC, neboť je jednoduchý, provozně spolehlivý a lze jím detekovat velký počet látek. Základním požadavkem je nízká absorbance mobilní fáze při použité vlnové délce detekce [51, 52].

Kyselina askorbová absorbuje UV záření v rozmezí 245–265 nm v závislosti na pH, avšak přímé spektrofotometrické stanovení znemožňuje často přítomnost dalších chromoforů v potravinách [32]. Kyselina dehydroaskorbová absorbuje dobře při 185 nm avšak nad 220 nm je absorbance slabá. Pro simultánní stanovení obou kyselin je třeba redukovat kyselinu dehydroaskorbovou na askorbovou [36].

Ve studii Skredeho a kol. [53] bylo použito spojení HPLC s UV detekcí pro stanovení vitaminu C v plodech 14 druhů ovoce, včetně bezu černého, v jehož plodech byla koncenrace AA stanovena v rozmezí 6,5 – 37 mg/100 g.

Dalšími detektory ve spojení s HPLC mohou být fluorescenční detektor, hmotnostní spektrometr nebo lze použít elektrochemickou detekci. Zatímco DHA je elektrochemicky inaktivní, kyselinu askorbovou lze pomocí coulometrie či amperometrie stanovit poměrně snadno. Množství DHA je možné určit z rozdílu odezvy před a po redukci. Tato metoda však vyžaduje zdlouhavou ekvilibraci kolony, konstantní iontovou sílu a pH roztoků, a je citlivá na

změny tlaku. Další možností je corona-charged aerosol detektor (CAD). Při simultánním stanovení kyseliny askorbové a dehydroaskorbové pomocí HILIC-CAD bylo zjištěno, že technika je méně citlivá než při použití UV detekce v případě AA, ale při kvantifikaci DHA je naopak mnohem citlivější, navíc nevyžaduje redukční/oxidační krok kyseliny askorbové/dehydroaskorbové [54].

2.4.2. Plynová chromatografie

Plynová chromatografie je metoda, která se zaměřuje na separaci těkavých sloučenin, nicméně ve studii Silvy [55] byla použita i pro stanovení celkového obsahu kyseliny askorbové. Hodnocenou matricí byla čerstvě vymačkaná pomerančová šťáva. Analýza zahrnovala několik jednoduchých kroků pro úpravu vzorku - centrifugaci, filtraci, redukci DHA dithiothreitolem, zmražení pomocí kapalného dusíku a lyofilizaci. Vysušený zbytek následně reagoval se směsí hexamethyldisilazan/acetonitril (2:8) v mikrovlnné troubě po dobu 5 minut při 180 W. Použit byl plamenově ionizační detektor (FID) [55].

2.4.3. Titrační metody

Bylo publikováno mnoho metod využívajících různá titrační činidla. Pro přímou titraci AA byl často používán 2,6-dichlorofenolindofenol (DCPIP) [18]. Tato metoda je založena na redukci DCPIP kyselinou askorbovou v kyselém prostředí. DCPIP je také označován jako Tillmanovo činidlo. V kyselém prostředí se jeho modré zbarvení mění na růžové. V přítomnosti kyseliny askorbové je činidlo redukováno a dochází k odbarvení roztoku. Zreagování veškeré kyseliny askorbové a tedy konec titrace nastává v momentu, kdy růžové zbarvení roztoku přetrvává po dobu alespoň 10 vteřin [56, 57].

Přestože je to oficiální metoda, není aplikovatelná na řadu farmaceutických přípravků obsahujících Fe (II), Sn (II), Cu (I), SO_2, SO_3^{2-} a $S_2O_3^{2-}$ ionty a také látky přirozeně se vyskytující v ovoci nebo biologickém materiálu jako třísloviny a sulfhydrylové sloučeniny, které jsou oxidovány titračním barvivem. Alkalické vzorky rovněž stěžují stanovení. Metoda je použitelná jen v případě, kdy je koncentrace kyseliny dehydroaskorbové zanedbatelná.

Dalším titračním činidlem je tetrachlorobenzochinon. Titrace se provádí v přítomnosti EDTA, která působí i jako chelatační činidlo. Bod ekvivalence je detekován zlatožlutým zbarvením roztoku.

Mezi další titrační činidla, sloužící ke stanovení kyseliny askorbové, patří např. dihydroxyindol, jód nebo brom [56].

2.4.4. Elektrochemické metody

Potenciometrie často slouží k zjišťování bodu ekvivalence při titračním stanovení. Potenciometrické titrace jsou založené na měření závislosti potenciálu vhodné indikační elektrody na objemu titračního činidla přidaného do titrovaného roztoku. Potenciometrické titrace jsou využívány ke stanovení obsahu vitaminu C ve vzorcích, kde vizuální detekce bodu ekvivalence není možná [56, 58].

Potenciometrickou titraci využili např. Kaack a Austed [18] ve své studii obsahu vitaminu C v plodech bezu černého. Stanovená koncentrace se pohybovala mezi 6 - 25 mg/100 g, což odpovídá koncentraci stanovené Skredem [53] pomocí HPLC.

Amperometrie, polarografie a coulometrie jsou dalšími technikami, které byly použity při stanovení vitaminu C, nicméně se v dnešní době využívají zřídka [56].

2.5. Stanovení aromaticky aktivních látek

2.5.1. Solid-phase microextraction (SPME)

Pro stanovení obsahu AAL v plodech bezu černého byla v rámci experimentální části této práce použita metoda SPME-GC-FID. SPME (solid-phase microextraction) neboli mikroextrakce tuhou fází je izolační metoda, při níž dochází k sjednocení procesu vzorkování a extrakce. Principem této techniky je sorpce složky vzorku na stacionární fázi pokrývající křemenné vlákno, které se nachází uvnitř kovové jehly. Jehla slouží k ochraně vlákna před mechanickým poškozením a k propíchnutí septa v zátce vialky, ve které se nachází matrice.

Vlákno o délce 1 cm pokryté polymerem je nejdůležitější součástí zařízení [59]. Nejčastěji se používají vlákna s vrstvou divinylbenzenu (DVB), polydimethylsiloxanu (PDMS), carboxenu (CAR^{TM}) a nebo jejich kombinace [60, 61]. Tloušťka stacionární fáze bývá 7 až 150 μm [61]. Silnější vrstva je schopna vyextrahovat více analytu než vrstva tenká. Proto se vlákno se silnější vrstvou používá pro zachycení těkavějších látek. Tenká vrstva naopak zajišťuje zrychlenou difůzi a uvolnění výše vroucích látek během tepelné desorpce [59, 60].

K výhodám této metody patří rychlost stanovení, citlivost a také vysoká přesnost [59].

Existují dva způsoby extrakce, a to DI-SPME (Direct Immersion), kdy je vlákno ponořeno přímo do vzorku - používá se především pro látky v kapalném skupenství a u některých tuhých látek, a HS-SPME (Headspace), kdy je vlákno umístěno nad vzorkem (v headspace prostoru). Tento postup je vhodný pro těkavé látky [59, 61].

SPME metoda má řadu aplikačních využití. Používá se v oblasti znečištění životního prostředí (PCB, pesticidy, fenoly, organokovové sloučeniny – Hg, Sn, Pb), ve farmaceutickém průmyslu k izolaci terpenických sloučenin, siličných drog, jednotlivých obsahových a účinných látek přítomných v synteticky připravených léčivech, dále v kosmetice, v potravinářství (vonné a chuťové látky, mastné kyseliny, nežádoucí exogenní i endogenní kontaminanty), setkáme se s ní také v toxikologii a jiných oborech [59].

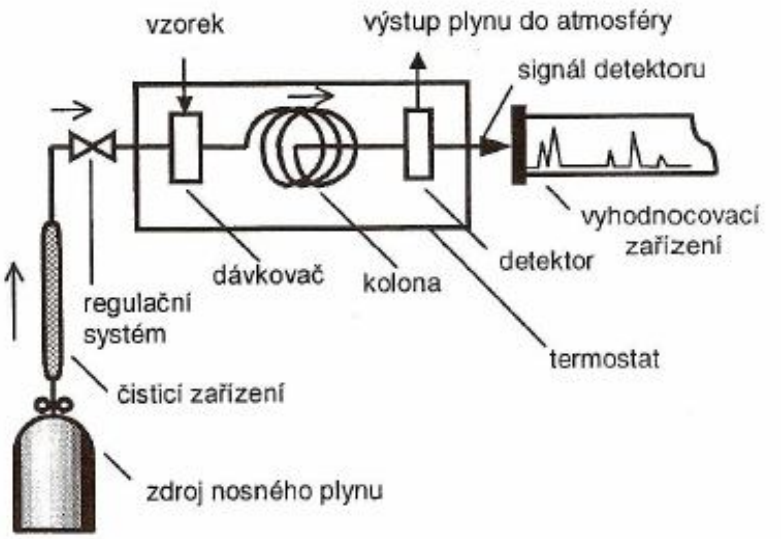
2.5.2. Plynová chromatografie (GC)

Gas chromatography (GC) neboli plynová chromatografie je separační metoda sloužící k oddělení složek obsažených ve vzorku. Vzorek se vnáší mezi dvě navzájem nemísitelné fáze, a to stacionární (nepohyblivou) a mobilní (pohyblivou). Vzorek umístěný na začátku chromatografické kolony je soustavou unášen díky pohybu mobilní fáze (nosného plynu). Aby mohl být vzorek transportován, musí se ihned přeměnit na plyn. V koloně pak mohou být složky vzorku zachycovány stacionární fází, což způsobí jejich zdržení. Ty složky, které jsou poutány silněji, se zdrží déle. Tím se postupně od sebe separují a na konec stacionární fáze se dříve dostávají složky méně zadržované (poutané slaběji). Látky opouštějící kolonu indikuje detektor. Signál z detektoru se vyhodnocuje a z časového průběhu jeho intenzity se určí druh a kvantitativní zastoupení složek [62].

Části plynového chromatografu [62, 63]:

- Zdroj nosného plynu – tlaková láhev obsahující vodík, dusík, helium nebo argon. Druh je dán charakterem analyzovaného vzorku. Nemá přímý vliv na separaci.
- Čistící zařízení – zachycuje vlhkost a nečistoty v nosném plynu.
- Regulační systém – zajišťuje stálý/programově se měnící průtok nosného plynu.
- Dávkovač – slouží pro zavedení vzorku do proudu nosného plynu.
- Kolona – zde se nachází stacionární fáze a dochází tu k separaci složek.
- Detektor – v této práci byl použit FID (Flame Ionization Detector) tedy plamenový ionizační detektor. Často používaným spojením je GC-MS (s hmotnostní detekcí).
- Termostat – udržuje vysokou teplotu dávkovače, kolony a detektoru, aby byl vzorek stále v plynném stavu. Běžně se pracuje při teplotách 50 – 300 °C.

Schéma plynového chromatografu znázorňuje Obrázek 11.



Obrázek 11: Schéma plynového chromatografu [62]

Plynová chromatografie je v současné době nejpoužívanější technikou pro stanovení těkavých AAL a byla použita i v řadě publikací zabývajících se různými produkty z bezu. Např. ve studii Kaacka a kol. [25], zabývající se vztahem mezi senzorickou kvalitou a těkavými látkami ve šťávě z plodů bezu černého, bylo využitím dynamické headspace ve spojení s GC-FID a GC-MS identifikováno a kvantifikováno 53 AAL. Hodnotitelé vyškolení pro senzorické rozpoznání bezového flavouru provedli hodnocení džusů a tyto výsledky byly dány do souvislosti s obsahem těkavých sloučenin. Tři sloučeniny s charakteristickou bezovou vůní (β-damascenon, nonanal a dihydroedulan) měly největší vliv na celkovou senzorickou kvalitu šťáv [25].

Olfaktometrická a kvantitativní analýza byla provedena i pro nápoj připravený z čerstvých bezových květů v práci Jorgensena a kol. [27]. Srovnáváno bylo pět kultivarů. Květy byly extrahovány ve vodném roztoku obsahující plátky oloupaného citronu, kyselinu vinnou a benzoát sodný. Těkavé látky uvolněné z bezového sirupu byly získány dynamickou headspace extrakcí a stanoveny opět pomocí GC-FID a GC-MS. Identifikováno bylo 59 AAL. Rose oxid, nerol oxid, hotrienol a nonanal přispívaly značnou mírou k charakteristické bezové vůni, kdežto linalool, R-terpineol a 4-methyl-3-penten-2-on byly spojovány s květinovými tóny. β-damascenon byl zahrnut do skupiny látek s ovocným aroma [27].

2.6. Statistické parametry pro zpracování naměřených dat

Pro statistické vyhodnocení naměřených dat byly použity následující parametry:

Aritmetický průměr

Aritmetický průměr je definován jako součet všech naměřených hodnot vydělených jejich počtem. Značí se vodorovným pruhem nad symbolem proměnné [64, 65].

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot (x_1 + x_2 + \ldots + x_n) = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^{n} x_i \tag{1}$$

kde n je počet měření x.

Směrodatná odchylka

Uvádí se ve stejných jednotkách, v jakých je vyjádřena veličina x. Charakterizuje rozptýlení jednotlivých hodnot x_i kolem aritmetického průměru. Směrodatná odchylka je mírou přesnosti série paralelních výsledků a je definována jako [64, 65]:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^{n} \left(x_i - \bar{x}\right)^2} \tag{2}$$

Relativní směrodatná odchylka

Relativní směrodatná odchylka udává procentuální rozptýlení od aritmetického průměru, uvádí se v procentech a je definována jako [64, 65]:

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \, [\%] \tag{3}$$

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem experimentální části této diplomové práce bylo stanovit aromatické profily plodů 18 odrůd bezu černého pomocí metody HS-SPME-GC-FID. Dále pak nalézt vhodné reakční podmínky pro redukci DHA na AA, ty aplikovat na vybrané vzorky plodů a následně stanovit celkový obsah vitaminu C ve vybraných vzorcích.

3.1. Stanovení aromaticky aktivních látek pomocí SPME-GC-FID

3.1.1. Pracovní pomůcky a přístroje

- plynový chromatograf TRACE GC (ThermoQuest Italia S. p. A., Itálie) s plamenově ionizačním detektorem, split/splitless injektorem a kapilární kolonou DB-WAX o rozměrech 30 m × 0,32 mm× 0,5 µm
- počítač PC, Intel Pentium Procesor, systém Microsoft Windows XP Profesional 2002, program Chrom-Card
- chladnička s mrazničkou AMICA, model AD 250
- vodní lázeň Julabo, model TW 12
- SPME vlákno SUPELCO Fiber s polární stacionární fází Carboxen/polydimethylsiloxan (CAR^{TM}/PDMS) o tloušťce filmu 85 µm
- mikropipety:
  - Labsystems Finnpipette (objem 0,2–2 µl)
  - Proline (objem 100–1000 µl)
  - Proline (objem 10–100 µl)
  - Proline (objem 0,5–10 µl)
  - jednorázové špičky
  - držák na pipety
- vialky (objem 4 ml) s kaučuk-teflonovým septem a šroubovacím uzávěrem
- parafilm PECHINEY PLASTIC PACKAGING - „M“
- stojan a držák
- stopky
- nůžky
- běžné laboratorní sklo
- analytické digitální váhy GR-202-EC, HELAGO, Itálie
- sušárna Memmert

3.1.2. Plyny

- dusík N_2 5.0 SIAD v tlakové láhvi s redukčním ventilem s kovovou membránou
- vodík H_2 5.5 SIAD v tlakové láhvi s redukčním ventilem
- vzduch 5.0 SIAD v tlakové láhvi s redukčním ventilem pro kyslík

3.1.3. Standardy aromaticky aktivních látek

V této práci bylo pro identifikaci a kvantifikaci AAL ve zkoumaných vzorcích plodů bezu černého použito 69 standardů vybraných těkavých látek:

- α-terpienol (2-(4-methyl- 1-cyclohex- 3-enyl) propan-2-ol pro syntézu), Merck, Německo
- β-damascenon (1-(2,6,6-trimethylcyclohexa-1,3-dien-1-yl)-but-2-en-1-on), SAFC, USA
- 2-methylbutan-1-ol 99%, Sigma-Aldrich, Německo
- 2-methylpropan-2-ol 99,5%, LACHEMA, Česká republika
- 3-hydroxybutan-2-on 98%, Merck, Německo
- 3-methylbutan-1-ol 98%, Merck, Německo
- 3-methylbutan-1-al 98%, Sigma-Aldrich, Německo
- 4-methylpentan-2-on, Loba Chemie Indo Austranal Co., Indie
- Aceton (propan-2-on), 99%, LACHEMA, Česká republika
- Benzaldehyd (fenylmethanal), REACHIM, Rusko
- Benzylalkohol (fenylmethanol), pro syntézu, LACHEMA, Česká republika
- Butan-1-ol čistý, LACHEMA, Česká republika
- Butan-2-ol, REONAL, Maďarsko
- Butan-2-on 99%, LACHEMA, Česká republika
- Butan-2,3-dion pro syntézu 97%, Merck, Německo
- Dekan-1-ol pro syntézu 99%, Merck, Německo
- Dekan-2-on pro syntézu 95%, Merck, Německo
- Dekanová kyselina pro syntézu, Merck, Německo
- E-hex-2-en-1-al 98%, Merck, Německo
- E-hex-3-en-1-ol 97%, Sigma-Aldrich, Německo
- E-okt-2-en-1-al 94%, Sigma-Aldrich, Německo
- Ethanal pro syntézu 99%, Merck, Německo
- Ethanol 96%, Lach-Ner, Česká republika
- Ethylbutanoát pro syntézu, 98%, Merck, Německo
- Ethyldekanoát pro syntézu 99%, Merck, Německo
- Ethylheptanoát pro syntézu, Merck, Německo
- Ethylhexanoát pro syntézu, Merck, Německo
- Ethyloktanoát 98%, Merck, Německo
- Ethylpentanoát pro syntézu, Merck, Německo
- Fenylethanal pro syntézu 90%, Sigma-Aldrich, Německo
- Fenylethanol pro syntézu 96%, Merck, Německo
- Heptan-2-ol pro syntézu 99%, Merck, Německo
- Heptanal 97%, Merck, Německo
- Heptan-2-on pro syntézu 98%, Merck, Německo
- Hexan-1-ol pro syntézu, Merck, Německo
- Hexanal pro syntézu 98%, Merck, Německo
- Hexanová kyselina pro syntézu, Merck, Německo
- isobutanol (2-methylpropan-1-ol) 99,5% , LACHEMA, Česká republika
- isomáselná kyselina (2-methylpropanová kyselina) pro syntézu 99%, Merck, Německo
- isovalerová kyselina (3-methylbutanová kyselina) pro syntézu 99%, Merck, Německo

- limonen (1-methyl-4-prop-1-en-2-yl-cyklohexen) 97%, Alfa-Aesar, Německo
- linalool (2,6-dimethylokta-2,7-dien-6-ol) 97%, Alfa-Aesar, Německo
- máselná kyselina (butanová kyselina), 99,5%, Sigma-Aldrich, Německo
- Methanol 99,5%, Lach-Ner, Česká republika
- Methylbutanoát pro syntézu, Merck, Německo
- Nonan-2-ol 98%, Merck, Německo
- Nonan-2-on pro syntézu 98%, Merck, Německo
- Nonanal pro syntézu, Merck, Německo
- Octan butylnatý (butylethanoát), 98%, LACHEMA, Česká republika
- Octan ethylnatý (ethylethanoát), p.a. 99,5%, LACHEMA, Česká republika
- Octan methylnatý (methylethanoát), 99%, Merck, Německo
- Octan propylnatý (propylethanoát), čistý, BRUXELUS, Belgie
- Octová kyselina (ethanová kyselina), 99%, Lach-Ner, Česká republika
- Okt-1-en-3-ol 98%, Sigma-Aldrich, Německo
- Oktan-1-ol, LACHEMA, Česká republika
- Oktan-2-ol 98%, Fluka Chemie, Švýcarsko
- Oktanal pro syntézu 98%, Merck, Německo
- Oktanová kyselina p.a., REACHIM, Rusko
- Pentan-1-ol 99%, LACHEMA, Česká republika
- Pentan-2-ol pro syntézu, Merck, Německo
- Pentan-2-on pro syntézu 99%, Merck, Německo
- Pentanal pro syntézu 98%, Merck, Německo
- Propan-1-ol p.a. 99,5%, LACHEMA, Česká republika
- Propan-2-ol 99,9%, LACHEMA, Česká republika
- Propanal pro syntézu 98%, Merck, Německo
- Propanová kyselina pro analýzu 99%, Merck, Německo
- Rose oxid 99%, Sigma-Aldrich, Německo
- Undekan-2-on pro syntézu, Merck, Německo
- Z-hex-3-en-1-ol pro syntézu 98%, Merck, Německo

3.1.4. Reálné vzorky plodů bezu černého

Plody bezu černého dodal Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o. Byly nasbírány na přelomu srpna a září 2013 a ihned zmraženy. Uchovávány byly v mrazícím boxu při teplotě -15 °C do samotné analýzy, která proběhla v dubnu 2014. Celkem bylo analyzováno 17 šlechtěných odrůd a planý bez, jejich seznam udává tabulka 4.

Tabulka 4: Seznam zkoumaných odrůd bezu černého

Číslo	Odrůda	Označení
1	Haschberg*	B01
2	Samdal	B02
3	Aurea	B03
4	Mammut	B04
5	Körsör	B05
6	Pregarten	B06
7	Weihenstephan	B07
8	Planý bez*	B08
9	Allesö	B09
10	Riese aus Voβloch*	B10
11	Sambu	B11
12	Sambo*	B12
13	Albida	B13
14	Bohatka*	B14
15	Sampo	B15
16	Samyl	B16
17	Heidegg	B17
18	Dana	B18

** Odrůdy vybrané pro stanovení vitaminu C (viz dále)*

3.1.5. Podmínky HS-SPME-GC-FID

Teplotní program GC, SPME vlákno, extrakční podmínky pro metodu SPME a ostatní parametry analýzy byly převzaty z bakalářské práce autorky [66].

- teplota vodní lázně: 35 °C
- doba temperování vzorku: 30 min
- doba extrakce (HS-SPME): 20 min
- doba desorpce: 20 min
- injektor: 250 °C, splitless injection
- nosný plyn: dusík N_2, optimální průtok 0,9 $ml \cdot min^{-1}$
- teplotní program: 40 °C s výdrží 1 minutu, vzestupný gradient 5 °C za minutu do 200 °C s výdrží 7 minut
- celková doba analýzy: 42 minut
- teplota detektoru FID: 220 °C
- průtok vodíku H_2: 35 $ml \cdot min^{-1}$
- průtok vzduchu: 350 $ml \cdot min^{-1}$
- make-up dusíku N_2: 30 $ml \cdot min^{-1}$

3.1.6. Příprava a analýza standardů AAL

Dané množství určitého standardu bylo napipetováno do vialky a jeho objem byl doplněn destilovanou vodou na 1 ml. Poté byla vialka uzavřena šroubovacím uzávěrem s plynotěsným septem, který byl následně ovinut parafinovým filmem pro zabezpečení minimálního úniku těkavých látek. Vialka byla umístěna do předem vyhřáté vodní lázně (35 °C) po dobu

20 minut. Následně bylo septum v zátce propíchnuto ocelovou jehlou chránící samotné vlákno, to bylo vysunuto do prostoru nad hladinou vzorku (headspace) a bylo tak ponecháno 20 minut. Poté bylo vlákno zasunuto zpět dovnitř jehly, bylo vytaženo z vialky a ihned přeneseno do injektoru plynového chromatografu a byla spuštěna GC analýza. Zde došlo k desorpci analytu z povrchu vlákna vlivem vysoké teploty a k jeho unášení proudem plynu do kolony.

3.1.7. Příprava a analýza vzorků plodů bezu černého

Do vialky byl odvážen 1 g zmražených plodů bezu černého, které byly následně jemně rozmělněny pomocí špachtličky a poté byla zapsána jejich hmotnost s přesností ± 0,0001 g. Vialka byla uzavřena šroubovacím uzávěrem s plynotěsným septem, ovinuta parafinovým filmem a dále následoval stejný postup jako u přípravy standardů – viz bod 3.1.6.

3.1.8. Vyhodnocení a statistické zpracování výsledků

Pro zpracování naměřených dat byl použit program Microsoft Office Excel 2003. Byly použity vztahy z kapitol 2.6.

Výsledky měření reálných vzorků jsou vyjádřeny ve tvaru průměr ± směrodatná odchylka (n=3) v $ng \cdot g^{-1}$ (resp. $\mu g \cdot g^{-1}$) vzorku.

3.2. Stanovení celkového obsahu vitaminu C pomocí HPLC

3.2.1. Pracovní pomůcky a přístroje

- ultrazvuková lázeň (Kraintek, SR)
- chladnička s mrazničkou (Gorenje, Slovinsko)
- homogenizátor T18 basic, Ultra-Turrax (IKA, Německo)
- přístroj na přípravu deionizované vody (Watrex, ČR)
- analytické digitální váhy GR-202-EC, HELAGO, Itálie
- HPLC přístroj:
    - Čerpadlo: Waters 515 HPLC Pump
    - Autosampler: Waters 717plus Autosampler
    - Kolona: Phenomenex, Gemini C18 150x4,6 mm; 5 µm + předkolona Security Guard
    - Termostat: DeltaChrom Temperature Control Unit
    - UV detektor: Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector
- počítač DELL, HPLC systém obsluhován pomocí softwaru Empower
- pH metr MPH 372 (Monokrystaly, ČR)
- vývěva
- injekční stříkačky, 2 ml (Chirana Injecta, SR)
- celulózové mikrofiltry 0,45 µm (Chromservis, ČR)
- filtrační papír č. 0 (Papírny Perštejn, ČR)
- mikropipety
- mikrozkumavky
- běžné laboratorní sklo

3.2.2. Chemikálie

- kyselina L-askorbová (Riedel-de Haen, Německo)
- kyselina dehydroaskorbová (Sigma-Aldrich, Německo)
- DTT (Sigma-Aldrich, Německo)
- TCEP (Sigma-Aldrich, Německo)
- L-cystein ≥ 97 % (Sigma-Aldrich, Německo)
- kyselina monohydrogenfosforečná (směs metafosforečné kyseliny a metafosfátu sodného, $NaPO_3$ 56-60 %) (VWR Chemicals, Belgie)
- dihydrogenfosforečnan draselný (Sigma-Aldrich, Německo)
- methanol, HPLC-grade (J. T. Baker, Holandsko)
- hydroxid draselný p.a. (Mr = 56) (Penta, ČR)
- deionizovaná voda

3.2.3. Reálné vzorky plodů bezu černého a rakytníku

K analýzám byly použity reálné vzorky plodů bezu černého uvedené v kapitole 3.1.4.

Plody rakytníku sloužící pro kontrolu použité metody redukce DHA na AA byly skladovány za stejných podmínek (v mrazícím boxu při -15 °C). Jednalo se o odrůdu Leicora, datum sběru 17.9.2012.

3.2.4. Podmínky metody HPLC

Následující podmínky metody HPLC byly převzaty z práce Cetkovské [67].

- Mobilní fáze: fosfátový pufr:methanol (9:1)
- Průtok: 1 $ml \cdot min^{-1}$
- Detekce: UV (254 nm)
- Nástřik: 20 µl
- Teplota: 30 °C

3.2.5. Příprava roztoků

- **Mobilní fáze – KH_2PO_4 : methanol (9:1)**

Navážka 13,6025 g KH_2PO_4 byla rozpuštěna v 900 ml deionizované vody. Poté bylo přidáno 100 ml methanolu a roztok byl na ultrazvuku odplyněn (15 minut).

- **Extrakční roztok kyseliny monohydrogenfosforečné (MPA)**

Nejdříve byl připraven 10% roztok kyseliny monohydrogenfosforečné rozpuštěním 17,0 g kyseliny ve 100 ml horké deionizované vody. Těchto 100 ml bylo poté naředěno v poměru 1:4 deionizovanou vodou na celkový objem 500 ml. Vznikl tak 2% roztok kyseliny monohydrogenfosforečné. Roztok byl uchováván v lednici.

3.2.5.1.Standardní roztoky

Všechny roztoky byly připraveny bezprostředně před analýzou.

- **Zásobní standardní roztok kyseliny askorbové**

Navážka 0,0250 g kyseliny askorbové byla rozpuštěna v 25 ml 2% roztoku kyseliny monohydrogenfosforečné. Výsledná koncentrace tak činila 1 $g \cdot l^{-1}$.

- **Standardní roztoky kyseliny askorbové pro kalibrační přímku**

Ze zásobního roztoku kyseliny askorbové bylo napipetováno 10, 100 a 400 µl do odměrných baněk o objemu 10 ml a ty byly doplněny 2% roztokem kyseliny monohydrogenfosforečné. Byly tak připraveny roztoky o koncentraci 1, 10 a 40 $mg \cdot l^{-1}$.

- **Zásobní standardní roztok kyseliny dehydroaskorbové**

Navážka 0,0050 g kyseliny dehydroaskorbové byla rozpouštěna v 10 ml 2% roztoku kyseliny monohydrogenfosforečné.

- **Standardní roztoky kyseliny dehydroaskorbové pro redukci**

Ze zásobního roztoku kyseliny dehydroaskorbové bylo napipetováno 0,8, 2 a 4 ml do odměrných baněk o objemu 10 ml a ty byly doplněny 2% roztokem kyseliny monohydrogenfosforečné. Jelikož se DHA velice špatně rozpouští, není možné dále uvažovat absolutní hodnoty koncentrací (40, 100 a 200 $mg \cdot l^{-1}$), ale používají se relativní množství (vztažená na jeden ze standardů). Před samotným redukčním krokem byly roztoky přefiltrovány přes celulózové mikrofiltry (0,45 µm).

Tabulka 5: Standardní roztoky DHA pro redukci

Označení roztoku	$V_{zásobního\ roztoku}$ (ml)	Teoretická koncentrace ($mg \cdot l^{-1}$)	Násobek koncentrace oproti koncentraci roztoku A (* B)
A	0,8	40	1
B	2	100	2,5
C	4	200	2*
			5

3.2.5.2. Roztoky KOH a redukčních činidel

- **Roztok KOH pro redukci při pH 7**

Navážka 0,9990 g KOH byla rozpuštěna deionizovanou vodou v 50ml odměrné baňce.

- **Roztok KOH pro redukci při pH 4**

Navážka 0,6310 g KOH byla rozpuštěna deionizovanou vodou v 50ml odměrné baňce.

- **Roztok DTT (c = 5 $mg \cdot ml^{-1}$)**

Navážka 0,0075 g DTT byla rozpuštěna v 1,5 ml roztoku KOH (pro redukci při pH 7, resp. 4).

- **Roztok TCEP (c = 5 $mg \cdot ml^{-1}$)**

Navážka 0,0075 g TCEP byla rozpuštěna v 1,5 ml roztoku KOH (pro redukci při pH 7, resp. 4).

- **Roztok L-cysteinu (c = 20 $mg \cdot ml^{-1}$)**

Navážka 0,0300 g L-cysteinu byla rozpuštěna v 1,5 ml roztoku KOH (pro redukci při pH 7, resp. 4).

Roztoky redukčních činidel byly připraveny bezprostředně před analýzou.

3.2.6. Analýza a redukce standardů a reálných vzorků

3.2.6.1. Vytvoření kalibrační křivky

Každý den byly před samotnými experimenty připraveny čerstvé standardní roztoky a byla proměřena kalibrační křivka. Standardní roztoky kyseliny askorbové o koncentracích 1, 10 a 40 $mg \cdot l^{-1}$ (viz 3.2.5) byly proměřeny vždy 3krát.

3.2.6.2. Stanovení koncentrace roztoku KOH

Nejprve bylo potřeba určit vhodnou koncentraci roztoku KOH, kterým se budou rozpouštět příslušná redukční činidla, tak, aby při smíchání s ekvivalentním množstvím 2% MPA bylo pH roztoku 7 (resp. 4), např. smícháním 2 ml roztoku KOH a 2 ml 2% MPA bylo výsledné pH = 7 (resp. 4).

Za tímto účelem byl připraven roztok KOH o přibližné koncentraci 1 $mol \cdot dm^{-3}$, který byl postupně ředěn. Jednotlivé zředěné roztoky byly vždy smíchány s ekvivalentním množstvím 2% MPA a bylo zjištěno pH směsi pomocí pH metru. Při dosažení pH 7 (resp. 4) byla stanovena konečná koncentrace roztoku KOH a vypočítána potřebná navážka KOH.

Po přípravě příslušného roztoku byla provedena kontrola pH směsi s 2% MPA.

3.2.6.3. Příprava extraktu z plodů

Do malé kádinky bylo odváženo na analytických vahách 6 g plodů bezu černého. K vzorku bylo přidáno cca 10 ml extrakčního činidla a vzorek byl rozmixován v homogenizátoru. Poté byly špachtlí odstraněny viditelné kousky ovoce zachycené na hlavici a pasteurovou pipetou byla opatrně omyta hlavice homogenizátoru do kádinky se vzorkem.

Obsah kádinky byl kvantitativně převeden do odměrné baňky o objemu 25 ml a byl doplněn extrakčním činidlem.

Obsah odměrné baňky byl dobře promíchán a následně zfiltrován přes Büchnerovu nálevku. Filtrát byl poté ještě přefiltrován přes mikrofiltr.

Plody rakytníku byly připraveny obdobným způsobem. Navážka však byla menší (4 g) a získaný extrakt byl zředěn 10násobně, kvůli vysokému počátečnímu obsahu kyseliny askorbové.

3.2.6.4. Základní redukční schéma

Příslušné množství roztoku (viz tabulka 6) standardu (resp. vzorku či vzorku + standardu) bylo napipetováno do mikrozkumavky a poté bylo přidáno redukční činidlo. Směs byla zamíchána na vortexu a ponechána 15 minut ve tmě při laboratorních podmínkách. Po redukci bylo k obsahu mikrozkumavky napipetováno ekvivalentní množství MPA pro úpravu pH zpět na původní hodnotu (zastavení redukce) a směs byla znovu promíchána na vortexu a neprodleně nastříknuta do HPLC.

Každý typ roztoku byl připraven do 3 mikrozkumavek a nastříknut vždy jen jednou (viz tabulka 7). Při redukci extraktu plodů byla koncentrace spikované AA 10 $mg \cdot l^{-1}$.

Schéma a struktura sekvence byla totožná pro všechna tři redukční činidla (DTT, TCEP, L-cystein).

Tabulka 6: Schéma pro přípravu roztoků pro redukci

Množství roztoku (µl)	**Blank**	**Standard (AA/DHAA)**	**Vzorek***	**Vzorek* + standard (AA/DHAA)**
vzorek	0	0	100	100
standard	0	100	0	100
MPA	100	0	0	0
Redukční činidlo	100	100	100	200
Redukce	Redukce	Redukce	Redukce	Redukce
MPA	200	200	200	400
Celkem	**400**	**400**	**400**	**800**

** Vzorek = extrakt z plodů*

Tabulka 7: Struktura sekvence (sample set)

Číslo vialky	**Standard (+ vzorek)**	**Koncentrace**
1	blank	-
2	AA (+ vzorek)	40 $mg \cdot l^{-1}$ (10 $mg \cdot l^{-1}$)
3	AA (+ vzorek)	40 $mg \cdot l^{-1}$ (10 $mg \cdot l^{-1}$)
4	AA (+ vzorek)	40 $mg \cdot l^{-1}$ (10 $mg \cdot l^{-1}$)
5	DHA (+ vzorek)	A
6	DHA (+ vzorek)	A
7	DHA (+ vzorek)	A
8	DHA (+ vzorek)	B
9	DHA (+ vzorek)	B
10	DHA (+ vzorek)	B
11	DHA (+ vzorek)	C
12	DHA (+ vzorek)	C
13	DHA (+ vzorek)	C

A, B, C – viz tabulka 5 v kapitole 3.2.5; vzorek = extrakt z plodů

3.2.6.5. Stanovení koncentrace AA v extraktu

Extrakt z plodů (viz 3.2.6.3) byl nastříknut do HPLC systému bez jakýchkoli úprav.

Pro srovnání bylo provedeno stanovení i ve zředěném extraktu, aby byly zachovány stejné podmínky jako u vzorku při redukci. K 100 µl extraktu bylo přidáno 100 µl roztoku KOH (viz 3.2.5.2). Směs byla promíchána na vortexu a ponechána 15 minut ve tmě při laboratorních podmínkách. Poté bylo přidáno 200 µl 2% MPA a směs byla opět promíchána na vortexu a nastříknuta do HPLC.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1. Stanovení AAL v plodech bezu černého

4.1.1. Identifikace AAL

Aromaticky aktivní látky byly izolovány pomocí SPME a následně detekovány GC-FID. Vyextrahované AAL byly identifikovány pomocí retenčních časů standardů a kvantifikovány podle ploch jejich píků. Přehled standardů použitých k identifikaci je uveden v tabulce 8. Pro každý z nich byl stanoven retenční čas a plocha píku odpovídající dané koncentraci.

Tabulka 8: Retenční časy, koncentrace a jim odpovídající plocha píku standardů

Standard	Retenční čas [min]	Koncetrace [$\mu g \cdot ml^{-1}$]	Plocha píku [mV·s]
ethanal	4,22	98,50	18316320
propanal	5,14	101,25	24534640
aceton	5,48	$2,5 \cdot 10^{-5}$	4314676
octan methylnatý	5,70	4,09	10379018
octan ethylnatý	6,69	4,50	29249320
butan-2-on	6,89	9,67	15838965
methanol	6,95	3168,00	26102260
2-methylpropan-2-ol	7,01	6,96	25174410
3-methylbutan-1-al	7,32	7,56	62097775
propan-2-ol	7,54	216,15	33523525
ethanol	7,75	404,25	50328270
butan-2,3-dion	8,56	14,85	49885110
octan propylnatý	8,58	2,80	45339805
pentan-2-on	8,70	1,62	54202360
pentanal	8,71	1,22	36716035
methylbutyrát	8,86	1,76	32152675
4-metylpentan-2-on	9,42	2,52	47527960
butan-2-ol	9,83	1575,00	46305970
ethylbutanoát	10,14	0,70	31595865
propan-1-ol	10,22	32,00	28559035
octan butylnatý	11,00	0,66	29383705
hexanal	11,26	2,03	23164895
2-methylpropan-1-ol	11,70	2005,00	54790325
ethylpentanoát	12,47	1,74	51928750
pentan-2-ol	12,53	324,00	39350625
butan-1-ol	13,26	12,15	34696610
heptanal	14,03	0,41	7922048
heptan-2-on	14,08	0,82	38703065
limonen	14,39	0,34	35092851
3-methylbutan-1-ol	14,87	364,50	30166805

Standard	Retenční čas [min]	Koncetrace [μg·ml^{-1}]	Plocha píku [mV·s]
2-methylbutan-1-ol	14,89	8,20	20018739
E-hex-2-en-1-al	15,22	169,20	21420771
ethylhexanoát	15,24	0,87	31542325
pentan-1-ol	16,03	6,11	42090560
oktanal	16,97	0,33	17552820
3-hydroxybutan-2-on	17,29	1,01	10975539
heptan-2-ol	17,77	0,33	9982116
ethylheptanoát	18,10	1,09	25258475
hexan-1-ol	18,72	1,64	10231235
rose-oxid	18,88	2,33	36746680
E-hex-3-en-1-ol	18,99	2,52	10033179
rose-oxid	19,32	0,93	15199315
Z-hex-3-en-1-ol	19,57	2,55	8415747
nonan-2-on	19,72	0,82	15574505
nonanal	19,86	0,21	26720185
oktan-2-ol	20,37	1,04	9815419
ethyloktanoát	20,73	0,52	16464710
E-okt-2-en-1-al	20,89	84,60	11110305
okt-1-en-3-ol	21,13	1,18	20789055
kyselina octová	21,16	787,50	11854125
dekan-2-on	22,37	0,66	13642535
nonan-2-ol	22,84	1,64	16661670
kyselina propanová	23,33	496,50	26573420
benzaldehyd	23,43	1,05	12802560
linalool	23,49	9,36	13404670
oktan-1-ol	23,83	0,17	35089624
kyselina 2-methylpropanová	24,10	149,63	12817420
undekan-2-on	24,91	0,66	20542395
kyselina máselná	25,50	240,00	33549820
β-damascenon	25,71	192,00	75072685
ethyldekanoát	25,77	0,65	39338910
fenylethanal	26,36	51,30	24262695
k. 3-methylbutanová	26,50	930,00	13692642
α-terpienol	27,36	0,01	30256005
dekan-1-ol	28,57	16,00	54500971
fenylethanol	29,85	20,24	5302282
β-damascenon	30,20	192,00	8364990
kyselina hexanová	30,34	186,00	30995045
benzylalkohol	31,26	26,25	5507813
kyselina oktanová	34,86	273,00	28565246
kyselina dekanová	41,39	100000,00	56969440

4.1.2. Analýza reálných vzorků

Analyzováno bylo celkem 18 odrůd bezu černého (17 šlechtěných odrůd a planý bez). Seznam vzorků je uveden v tabulce 4 v kapitole 3.1.4. Podmínky a přesný postup analýzy jsou uvedeny v kapitolách 3.1.6 a 3.1.7. Identifikace a kvantifikace vyextrahovaných aromatických látek byla provedena na základě porovnání se standardy uvedenými v tabulce 8 v kapitole 4.1.1. Každý vzorek byl proměřen třikrát (n = 3).

Cílem bylo zjistit, zda jsou mezi jednotlivými odrůdami rozdíly v obsahu AAL a zda se liší aromatický profil planého bezu a šlechtěných odrůd bezu, poněvadž jedním z cílů šlechtění bezu je dosažení lepších chuťových a aromatických vlastností plodů.

Celkem bylo ve vzorcích identifikováno a kvantifikováno 24 různých těkavých aromaticky aktivních látek. Z nich bylo 12 alkoholů, 5 aldehydů, 4 esterů, 1 kyselina a 2 „jiné“ sloučeniny - β-damascenon a linalool. Ty byly hodnoceny samostatně, jelikož mají podle některých autorů [25-28] dominantní vliv na charakteristické aroma bezu. V žádném ze zkoumaných vzorků nebyl identifikován žádný keton. Složení jednotlivých vzorků se lišilo, žádný z nich neobsahoval všechny identifikované látky současně.

Zjištěné koncentrace jednotlivých sloučenin rozdělené do skupin jsou uvedeny v tabulkách 9 až 14, chromatogramy v přílohách 2 až 19.

Tabulka 9: Koncentrace AAL přítomných ve vzorcích B01, B02, B03 v ng·g^{-1}

ALKOHOLY	**B01**	**B02**	**B03**
methanol *	40,52 ± 1,31	231,73 ± 54,65	77,54 ± 3,18
ethanol *	6,45 ± 2,09	6,03 ± 1,84	3,42 ± 0,42
pentan-2-ol	nd	nd	nd
butan-1-ol	81,01 ± 16,60	74,38 ± 2,13	91,04 ± 4,16
2-methylbutan-1-ol	nd	nd	nd
pentan-1-ol	29,64 ± 3,24	6,50 ± 0,77	21,66 ± 1,70
hexan-1-ol	58,16 ± 14,85	22,72 ± 4,56	227,95 ± 0,22
E-3-hexenol	nd	nd	nd
Z-3-hexen-1-ol	111,58 ± 24,68	49,33 ± 3,01	615,70 ± 50,62
1-okten-3-ol	nd	nd	nd
nonan-2-ol	nd	nd	6,30 ± 0,01
benzylalkohol	nd	nd	nd
celkem *	**128,17 ± 3,46**	**237,92 ± 56,51**	**81,92 ± 3,66**
ALDEHYDY			
acetaldehyd *	5,24 ± 0,32	4,36 ± 0,04	1,26 ± 0,05
3-methylbutan-1-al	11,96 ± 2,21	6,18 ± 0,55	nd
pentanal	4,16 ± 0,43	2,34 ± 0,10	4,71 ± 0,05
hexanal	98,67 ± 7,33	35,89 ± 2,30	46,46 ± 2,94
E-2-hexenal *	7,99 ± 0,28	5,28 ± 0,30	17,72 ± 5,75
celkem *	**13,34 ± 0,61**	**9,68 ± 0,34**	**19,02 ± 5,80**
ESTERY			
octan methylnatý	nd	29,75 ± 1,87	13,43 ± 0,49
octan ethylnatý	5,69 ± 0,30	5,81 ± 0,49	nd
methylbutanoát	7,59 ± 0,23	6,32 ± 0,43	1,35 ± 0,14
ethylbutanoát	1,05 ± 0,07	nd	nd
celkem	**14,33 ± 0,60**	**41,89 ± 2,79**	**14,77 ± 0,63**
KYSELINY			
kyselina octová	**nd**	**nd**	**nd**
OSTATNÍ			
linalool	51,80 ± 9,20	nd	63,88 ± 11,91
β-damascenon	1527,60 ± 310,57	1365,79 ± 205,98	1431,22 ± 62,21
celkem	**1579,40 ± 319,77**	**1365,79 ± 205,98**	**1495,11 ± 74,12**
CELKEM AAL *	**143,11 ± 4,39**	**249,00 ± 57,06**	**102,46 ± 9,54**

** koncentrace v µg·g^{-1}, nd = nebylo detekováno, značení vzorků viz tabulka 4*

Tabulka 10: Koncentrace AAL přítomných ve vzorcích B04, B05, B06 v ng·g^{-1}

ALKOHOLY	**B04**	**B05**	**B06**
methanol *	57,80 ± 1,63	92,28 ± 17,54	53,12 ± 3,64
ethanol *	6,75 ± 1,03	10,74 ± 1,11	5,76 ± 0,52
pentan-2-ol	nd	nd	nd
butan-1-ol	77,62 ± 2,33	96,73 ± 6,74	75,07 ± 7,76
2-methylbutan-1-ol	nd	50,34 ± 11,04	nd
pentan-1-ol	12,68 ± 3,73	7,68 ± 2,15	45,44 ± 13,73
hexan-1-ol	75,36 ± 4,18	26,02 ± 7,43	54,70 ± 15,32
E-3-hexenol	nd	nd	nd
Z-3-hexen-1-ol	120,41 ± 8,73	29,51 ± 0,27	27,66 ± 6,23
1-okten-3-ol	nd	nd	nd
nonan-2-ol	nd	nd	nd
benzylalkohol	nd	nd	nd
celkem *	**64,84 ± 2,68**	**103,24 ± 18,68**	**59,08 ± 4,21**
ALDEHYDY			
acetaldehyd *	2,99 ± 0,29	6,66 ± 0,19	4,43 ± 0,07
3-methylbutan-1-al	nd	62,87 ± 17,85	14,40 ± 0,81
pentanal	3,57 ± 0,82	3,29 ± 1,07	5,26 ± 1,18
hexanal	22,16 ± 3,14	62,04 ± 4,04	66,73 ± 8,04
E-2-hexenal *	2,66 ± 0,54	4,06 ± 0,04	8,86 ± 1,39
celkem *	**5,67 ± 0,83**	**10,84 ± 0,26**	**13,38 ± 1,48**
ESTERY			
octan methylnatý	nd	23,05 ± 4,95	19,39 ± 2,46
octan ethylnatý	2,89 ± 1,30	nd	4,33 ± 0,21
methylbutanoát	0,81 ± 0,10	3,75 ± 1,02	5,30 ± 0,20
ethylbutanoát	nd	nd	nd
celkem	**3,70 ± 1,40**	**26,80 ± 5,97**	**29,03 ± 2,87**
KYSELINY			
kyselina octová *	**2,78 ± 0,77**	**nd**	**nd**
OSTATNÍ			
linalool	70,80 ± 11,74	51,67 ± 12,36	80,74 ± 3,46
β-damascenon	1332,98 ± 254,27	1262,83 ± 96,73	1115,33 ± 107,59
celkem	**1403,78 ± 266,01**	**1314,5 ± 109,09**	**1196,07 ± 111,05**
CELKEM AAL *	**74,70 ± 4,55**	**115,42 ± 19,06**	**73,68 ± 5,80**

** koncentrace v µg·g^{-1}, nd = nebylo detekováno, značení vzorků viz tabulka 4*

Tabulka 11: Koncentrace AAL přítomných ve vzorcích B07, B08, B09 v ng·g^{-1}

ALKOHOLY	**B07**	**B08**	**B09**
methanol *	69,63 ± 2,36	79,64 ± 1,86	400,96 ± 48,64
ethanol *	7,20 ± 0,31	7,14 ± 0,34	6,80 ± 1,38
pentan-2-ol	nd	800,44 ± 190,13	nd
butan-1-ol	68,27 ± 1,13	45,42 ± 5,83	67,89 ± 1,00
2-methylbutan-1-ol	nd	nd	27,30 ± 3,96
pentan-1-ol	14,00 ± 3,62	26,96 ± 2,18	10,02 ± 1,71
hexan-1-ol	114,05 ± 33,16	142,87 ± 30,01	120,43 ± 4,15
E-3-hexenol	12,60 ± 0,50	16,57 ± 1,03	15,33 ± 0,10
Z-3-hexen-1-ol	240,49 ± 76,31	69,09 ± 5,18	322,34 ± 20,77
1-okten-3-ol	nd	nd	nd
nonan-2-ol	7,65 ± 1,65	nd	8,01 ± 1,24
benzylalkohol	nd	nd	nd
celkem *	**77,29 ± 2,79**	**87,88 ± 2,43**	**408,33 ± 50,05**
ALDEHYDY			
acetaldehyd *	4,45 ± 0,44	3,63 ± 0,38	2,49 ± 0,23
3-methylbutan-1-al	28,43 ± 2,19	16,19 ± 2,29	15,74 ± 0,52
pentanal	3,59 ± 0,67	11,65 ± 2,41	2,93 ± 0,22
hexanal	132,09 ± 12,03	94,56 ± 11,41	67,80 ± 16,55
E-2-hexenal *	11,76 ± 1,77	17,87 ± 2,17	9,45 ± 1,15
celkem *	**16,38 ± 2,22**	**21,63 ± 2,56**	**12,03 ± 1,40**
ESTERY			
octan methylnatý	26,10 ± 0,29	nd	nd
octan ethylnatý	5,27 ± 0,03	14,07 ± 2,54	nd
methylbutanoát	5,87 ± 1,30	nd	nd
ethylbutanoát	nd	1,15 ± 0,22	nd
celkem	**37,24 ± 1,62**	**15,22 ± 2,76**	**nd**
KYSELINY			
kyselina octová *	**4,07 ± 0,87**	**nd**	**10,6 ± 0,82**
OSTATNÍ			
linalool	74,17 ± 19,83	121,02 ± 17,60	93,61 ± 22,65
β-damascenon	1386,78 ± 173,03	1753,25 ± 188,13	1697,4 ± 29,13
celkem	**1460,95 ± 192,86**	**1874,28 ± 205,73**	**1791,01 ± 51,77**
CELKEM AAL *	**99,24 ± 6,07**	**111,40 ± 5,21**	**432,75 ± 52,32**

** koncentrace v µg·g^{-1}, nd = nebylo detekováno, značení vzorků viz tabulka 4*

Tabulka 12: Koncentrace AAL přítomných ve vzorcích B10, B11, B12 v ng·g^{-1}

ALKOHOLY	**B10**	**B11**	**B12**
methanol *	92,50 ± 8,93	401,23 ± 15,87	92,98 ± 2,11
ethanol *	6,38 ± 0,52	12,14 ± 0,11	10,19 ± 2,86
pentan-2-ol	nd	nd	nd
butan-1-ol	64,47 ± 0,66	74,34 ± 0,31	60,48 ± 4,74
2-methylbutan-1-ol	129,34 ± 5,83	nd	47,07 ± 7,85
pentan-1-ol	21,44 ± 0,94	70,20 ± 2,80	30,80 ± 8,16
hexan-1-ol	168,78 ± 12,74	58,79 ± 6,12	196,12 ± 34,18
E-3-hexenol	23,29 ± 0,19	16,57 ± 0,62	19,31 ± 2,49
Z-3-hexen-1-ol	825,25 ± 34,85	60,58 ± 10,85	778,50 ± 82,89
1-okten-3-ol	6,44 ± 1,08	nd	5,99 ± 1,59
nonan-2-ol	8,05 ± 0,09	nd	6,60 ± 0,39
benzylalkohol	732,12 ± 17,79	nd	450,26 ± 100,90
celkem *	**100,86 ± 9,53**	**413,65 ± 15,89**	**104,77 ± 5,22**
ALDEHYDY			
acetaldehyd *	3,60 ± 0,77	3,59 ± 0,15	3,56 ± 1,08
3-methylbutan-1-al	24,1 ± 8,30	nd	14,75 ± 2,38
pentanal	2,02 ± 0,39	5,95 ± 0,17	4,82 ± 1,05
hexanal	42,63 ± 5,18	84,44 ± 12,47	77,76 ± 13,72
E-2-hexenal *	1,62 ± 0,55	1,79 ± 0,45	6,59 ± 0,36
celkem *	**5,29 ± 1,34**	**5,47 ± 0,62**	**10,25 ± 1,46**
ESTERY			
octan methylnatý	nd	25,85 ± 4,43	nd
octan ethylnatý	nd	nd	10,79 ± 2,47
methylbutanoát	nd	3,35 ± 0,09	7,07 ± 0,05
ethylbutanoát	nd	nd	1,04 ± 0,29
celkem	**nd**	**29,20 ± 4,52**	**18,89 ± 2,82**
KYSELINY			
kyselina octová	**nd**	**nd**	**nd**
OSTATNÍ			
linalool	983,06 ± 264,22	42,76 ± 7,16	167,46 ± 25,73
β-damascenon	1604,17 ± 138,04	1676,93 ± 127,52	1956,21 ± 300,71
celkem	**2587,24 ± 402,26**	**1719,69 ± 134,69**	**2123,67 ± 326,44**
CELKEM AAL *	**108,74 ± 11,27**	**420,87 ± 16,65**	**117,15 ± 7,01**

** koncentrace v µg·g^{-1}, nd = nebylo detekováno, značení vzorků viz tabulka 4*

Tabulka 13: Koncentrace AAL přítomných ve vzorcích B13, B14, B15 v ng·g^{-1}

ALKOHOLY	**B13**	**B14**	**B15**
methanol *	92,87 ± 2,49	50,84 ± 1,73	206,99 ± 3,30
ethanol *	2,33 ± 0,17	3,05 ± 0,29	7,61 ± 0,22
pentan-2-ol	850,61 ± 95,14	440,05 ± 28,54	nd
butan-1-ol	45,93 ± 3,21	28,10 ± 2,18	43,43 ± 2,92
2-methylbutan-1-ol	29,08 ± 2,07	nd	18,44 ± 0,76
pentan-1-ol	95,32 ± 16,00	27,62 ± 3,28	22,52 ± 0,11
hexan-1-ol	98,95 ± 21,48	70,24 ± 7,57	36,57 ± 5,88
E-3-hexenol	nd	nd	nd
Z-3-hexen-1-ol	256,56 ± 25,72	81,46 ± 15,62	26,71 ± 4,34
1-okten-3-ol	4,32 ± 0,68	nd	nd
nonan-2-ol	6,41 ± 0,91	nd	nd
benzylalkohol	nd	nd	nd
celkem *	**96,59 ± 2,82**	**54,53 ± 2,07**	**214,74 ± 3,54**
ALDEHYDY			
acetaldehyd *	3,13 ± 0,23	2,00 ± 0,03	2,41 ± 0,04
3-methylbutan-1-al	129,14 ± 8,06	12,16 ± 0,44	nd
pentanal	51,10 ± 7,89	5,22 ± 0,25	2,73 ± 0,07
hexanal	141,67 ± 7,60	133,04 ± 13,54	57,39 ± 5,40
E-2-hexenal *	19,64 ± 2,56	9,81 ± 0,13	1,28 ± 0,16
celkem *	**23,10 ± 2,81**	**11,97 ± 0,17**	**3,74 ± 0,21**
ESTERY			
octan methylnatý	16,86 ± 4,23	nd	24,10 ± 2,57
octan ethylnatý	3,18 ± 0,72	nd	3,54 ± 0,21
methylbutanoát	8,00 ± 1,10	6,50 ± 0,02	3,21 ± 0,05
ethylbutanoát	nd	nd	nd
celkem	**28,03 ± 6,05**	**6,50 ± 0,02**	**30,84 ± 2,82**
KYSELINY			
kyselina octová	**nd**	**nd**	**nd**
OSTATNÍ			
linalool	202,89 ± 31,32	62,91 ± 9,92	nd
β-damascenon	1667,64 ± 33,43	1608,88 ± 108,19	1396,44 ± 21,42
celkem	**1870,53 ± 64,75**	**1671,79 ± 118,11**	**1396,44 ± 21,42**
CELKEM AAL *	**121,58 ± 5,70**	**68,18 ± 2,36**	**219,91 ± 3,77**

** koncentrace v µg·g^{-1}, nd = nebylo detekováno, značení vzorků viz tabulka 4*

Tabulka 14: Koncentrace AAL přítomných ve vzorcích B16, B17, B18 v ng·g^{-1}

ALKOHOLY	**B16**	**B17**	**B18**
methanol *	193,49 ± 16,69	44,14 ± 9,66	39,03 ± 0,19
ethanol *	9,69 ± 2,79	3,63 ± 0,30	4,52 ± 0,08
pentan-2-ol	nd	nd	nd
butan-1-ol	45,77 ± 1,49	44,82 ± 3,73	50,03 ± 1,91
2-methylbutan-1-ol	21,17 ± 1,30	20,40 ± 0,03	22,31 ± 1,33
pentan-1-ol	10,79 ± 0,09	41,93 ± 5,38	10,13 ± 2,55
hexan-1-ol	87,45 ± 3,53	38,20 ± 2,26	46,06 ± 3,36
E-3-hexenol	nd	nd	nd
Z-3-hexen-1-ol	458,43 ± 8,14	120,35 ± 20,88	81,58 ± 4,81
1-okten-3-ol	nd	nd	nd
nonan-2-ol	4,63 ± 0,61	nd	nd
benzylalkohol	nd	nd	nd
celkem *	**203,80 ± 19,49**	**48,03 ± 9,99**	**43,76 ± 0,28**
ALDEHYDY			
acetaldehyd *	3,79 ± 0,24	3,63 ± 0,23	2,35 ± 0,21
3-methylbutan-1-al	9,29 ± 3,32	11,58 ± 1,79	16,15 ± 2,61
pentanal	2,70 ± 0,61	4,46 ± 0,41	2,98 ± 0,71
hexanal	115,96 ± 30,65	31,56 ± 4,67	55,34 ± 6,77
E-2-hexenal *	1,51 ± 0,32	3,20 ± 0,47	4,42 ± 0,93
celkem *	**5,43 ± 0,60**	**6,87 ± 0,71**	**6,84 ± 1,16**
ESTERY			
octan methylnatý	nd	nd	nd
octan ethylnatý	12,95 ± 1,93	nd	3,07 ± 0,44
methylbutanoát	3,83 ± 0,64	4,31 ± 1,02	3,89 ± 0,35
ethylbutanoát	1,24 ± 0,19	nd	nd
celkem	**18,02 ± 2,76**	**4,31 ± 1,02**	**6,96 ± 0,78**
KYSELINY			
kyselina octová *	**3,89 ± 0,63**	**nd**	**nd**
OSTATNÍ			
linalool	76,52 ± 22,01	82,98 ± 1,48	67,10 ± 11,38
β-damascenon	1767,68 ± 138,28	973,41 ± 61,76	945,93 ± 11,84
celkem	**1844,20 ± 160,30**	**1056,40 ± 63,24**	**1013,03 ± 23,22**
CELKEM AAL *	**214,98 ± 20,88**	**55,97 ± 10,76**	**51,62 ± 1,46**

** koncentrace v µg·g^{-1}, nd = nebylo detekováno, značení vzorků viz tabulka 4*

4.1.3. Srovnání obsahu aromatických látek v jednotlivých odrůdách bezu

Celkový počet identifikovaných sloučenin ve vzorcích se pohyboval v rozmezí 15 až 21, jak je uvedeno v tabulce 15 společně s počtem jednotlivých látek v daných skupinách (alkoholy, aldehydy, estery, kyseliny, ostatní).

V odrůdě Sambo (B12) bylo identifikováno nejvíce AAL, celkem 21, poté v jediné bílé odrůdě Albida (B13), celkem 20. U planého bezu bylo nalezeno 17 AAL.

Nejvyšší zastoupení co do počtu látek měly jednoznačně alkoholy (12 z 24).

Srovnání koncentrací jednotlivých skupin mezi odrůdami zobrazují grafy 3 až 8. Rozdíl mezi nejvyšší (Allesö – B09) a nejnižší (Dana – B18) celkovou koncentrací AAL byl téměř devítinásobný.

Navzdory očekávání, u planého bezu byla stanovena celková koncentrace AAL (111,40 ± 5,21 $\mu g \cdot g^{-1}$) v podobném rozsahu jako u většiny ostatních šlechtěných odrůd. Výrazně vyšší koncentraci měly jen odrůdy Allesö (B09) (432,75 ± 52,32 $\mu g \cdot g^{-1}$) a Sambu (B11) (420,87 ± 16,65 $\mu g \cdot g^{-1}$), u odrůdy Samdal (B02) byla koncentrace přibližně dvojnásobná (249,00 ± 57,06 $\mu g \cdot g^{-1}$). Naopak nižší, asi poloviční koncentrace byla stanovena u odrůd Heidegg (B17) (55,97 ± 10,76 $\mu g \cdot g^{-1}$) a Dana (B18) (51,62 ± 1,46 $\mu g \cdot g^{-1}$).

Porovnání celkového obsahu alkoholů zobrazuje graf 4. Zde je patrný stejný trend jako u celkové koncentrace, jelikož právě alkoholy tvořily převážnou část všech AAL (76 až 93 %). Z kvantitativního hlediska byly nejvýznamnější methanol a ethanol, které byly spolu s butanolem, pentanolem, hexanolem a Z-3-hexen-1-olem identifikovány ve všech vzorcích. Oproti tomu benzylalkohol byl stanoven pouze ve dvou odrůdách, Riese aus Voβloch (B10) a Sambo (B12).

Obsah aldehydů byl velmi proměnlivý, pohyboval se v rozmezí 3,74 až 23,10 $\mu g \cdot g^{-1}$, srovnání zachycuje graf 5. Nejvyšší koncentrace byla stanovena u Albidy (B13), nejnižší v odrůdě Sampo (B15). Planý bez měl druhou nejvyšší koncentraci (21,63 ± 2,56 $\mu g \cdot g^{-1}$). Identifikováno bylo 5 aldehydů, přičemž všechny s výjimkou 3-methylbutan-1-alu byly identifikovány ve všech vzorcích. Z kvantitativního hlediska byly nejvýznamnější acetaldehyd a E-2-hexenal. Pentanal, hexanal a 3-methylbutan-1-al se nacházely v množství menším než 1 $\mu g \cdot g^{-1}$.

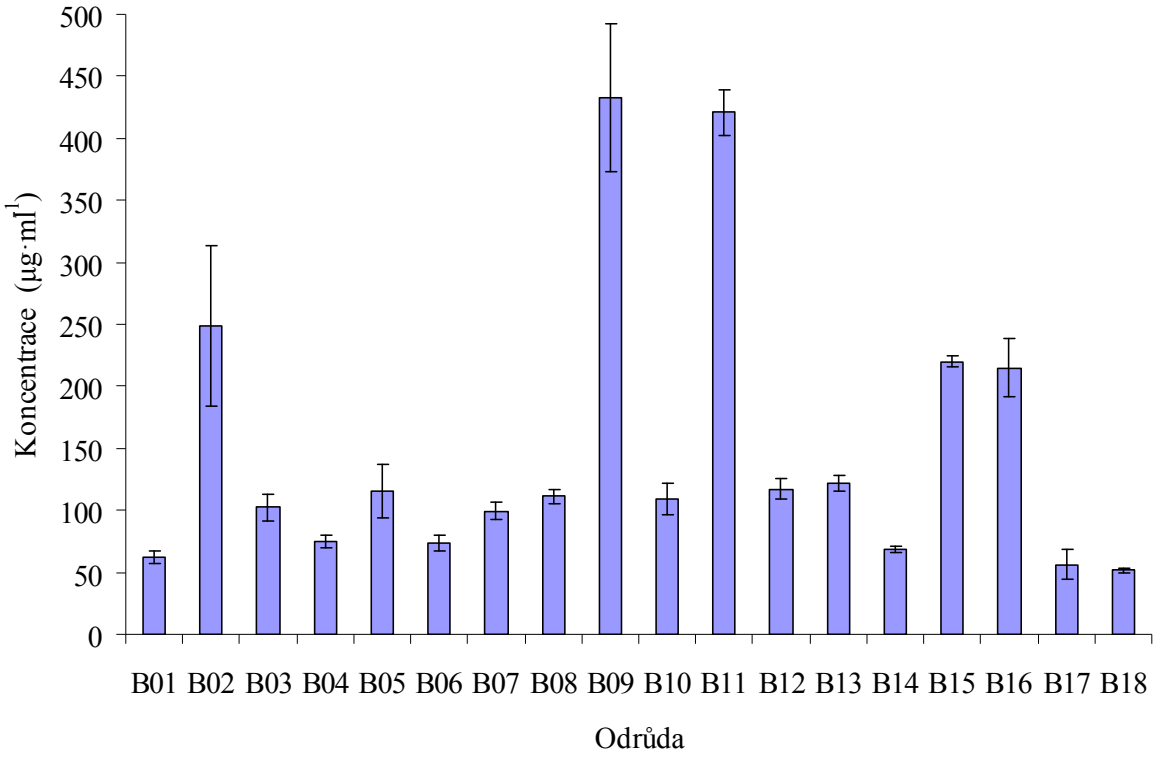
Z esterů se vyskytovaly ve vzorcích methylacetát, ethylacetát, methylbutanoát a ethylbutanoát. V žádné odrůdě nebyly nalezeny všechny čtyři estery současně. Graf 6 porovnává celkové zjištěné koncentrace esterů. Mezi jednotlivými odrůdami byly pozorovány značné rozdíly. Koncentrace v planém bezu byla průměrná (15,22 ± 2,76 $ng \cdot g^{-1}$). Nejvyšší koncentrace byla stanovena pro Samdal (B02) (41,89 ± 2,79 $ng \cdot g^{-1}$). Ve dvou odrůdách, B09 a B10, se estery nevyskytovaly vůbec.

Kyselina octová byla jedinou kyselinou identifikovanou ve vzorcích plodů. Stanovena byla pouze ve čtyřech odrůdách – B04, B07, B09 a B16. Její koncentrace byla nejvyšší v B09 (10,6 ± 0,82 $\mu g \cdot g^{-1}$), viz graf 7.

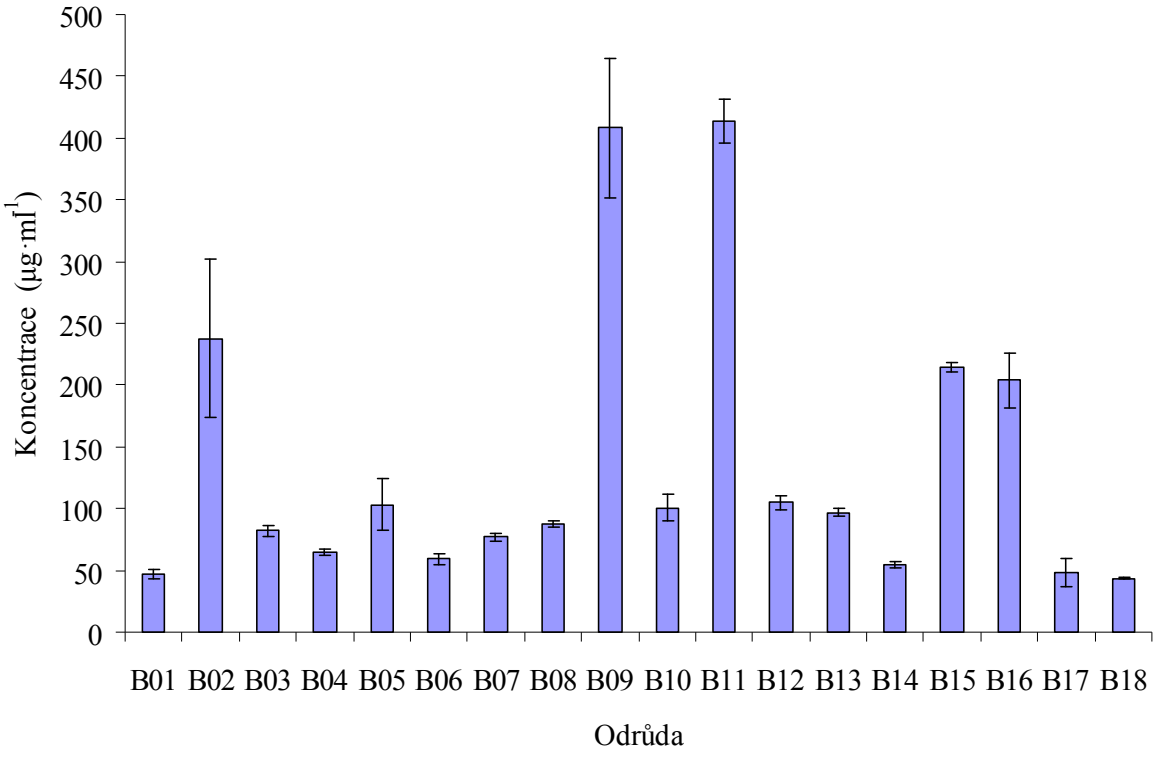
β-damascenon a linalool jsou považovány za jedny z nejdůležitějších sloučenin odpovědných za charakteristické aroma bezu [25-28]. Rozdíly v obsahu těchto látek mezi odrůdami byly nízké, průměrná hodnota se pohybovala kolem 1,5 $\mu g \cdot ml^{-1}$. β-damascenon byl stanoven ve všech vzorcích, linalool nebyl identifikován pouze ve dvou odrůdách (B02 a B15), viz graf 8.

Tabulka 15: Počet sloučenin identifikovaných v jednotlivých vzorcích plodů bezu černého (značení vzorků viz tabulka 4)

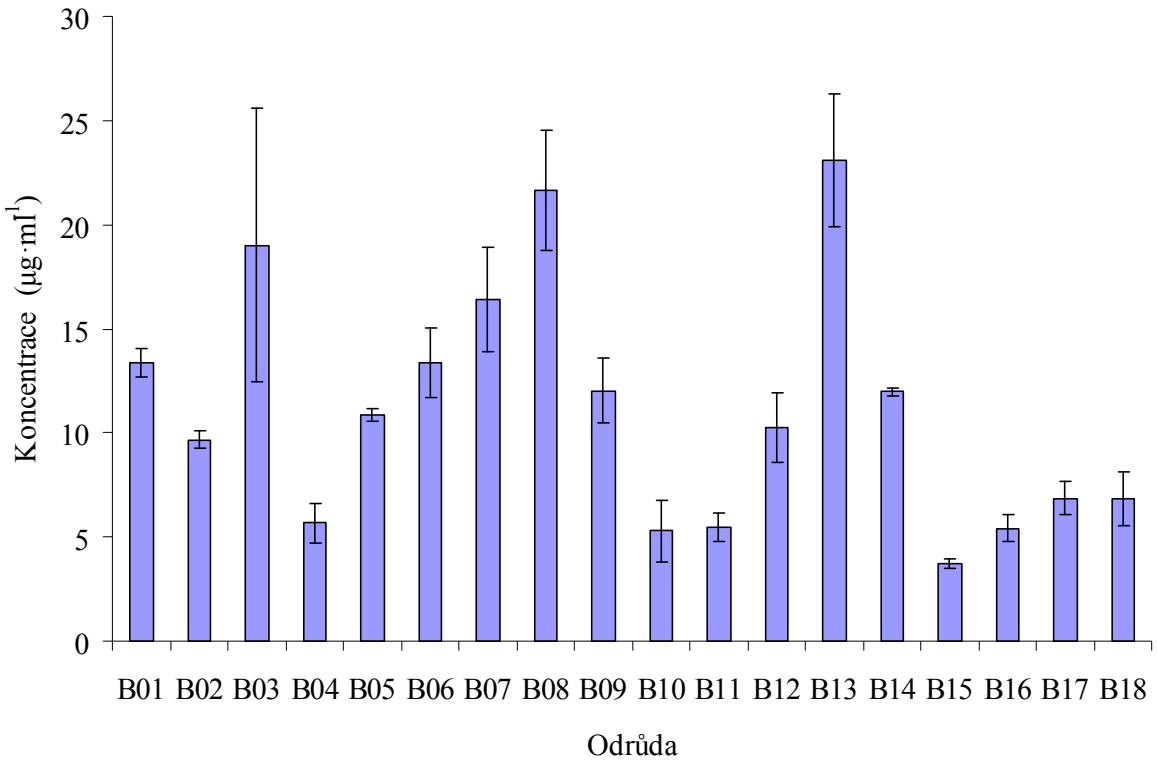
Skupina	Alkoholy	Aldehydy	Estery	Kyseliny	Ostatní	Celkem
B01	6	5	3	0	2	**16**
B02	6	5	3	0	1	**15**
B03	7	4	2	0	2	**15**
B04	6	4	2	1	2	**15**
B05	7	5	2	0	2	**16**
B06	6	5	3	0	2	**16**
B07	8	5	3	1	2	**19**
B08	8	5	2	0	2	**17**
B09	9	5	0	1	2	**17**
B10	11	5	0	0	2	**18**
B11	7	4	2	0	2	**15**
B12	11	5	3	0	2	**21**
B13	10	5	3	0	2	**20**
B14	7	5	1	0	2	**15**
B15	7	4	3	0	1	**15**
B16	8	5	3	1	2	**19**
B17	7	5	1	0	2	**15**
B18	7	5	2	0	2	**15**



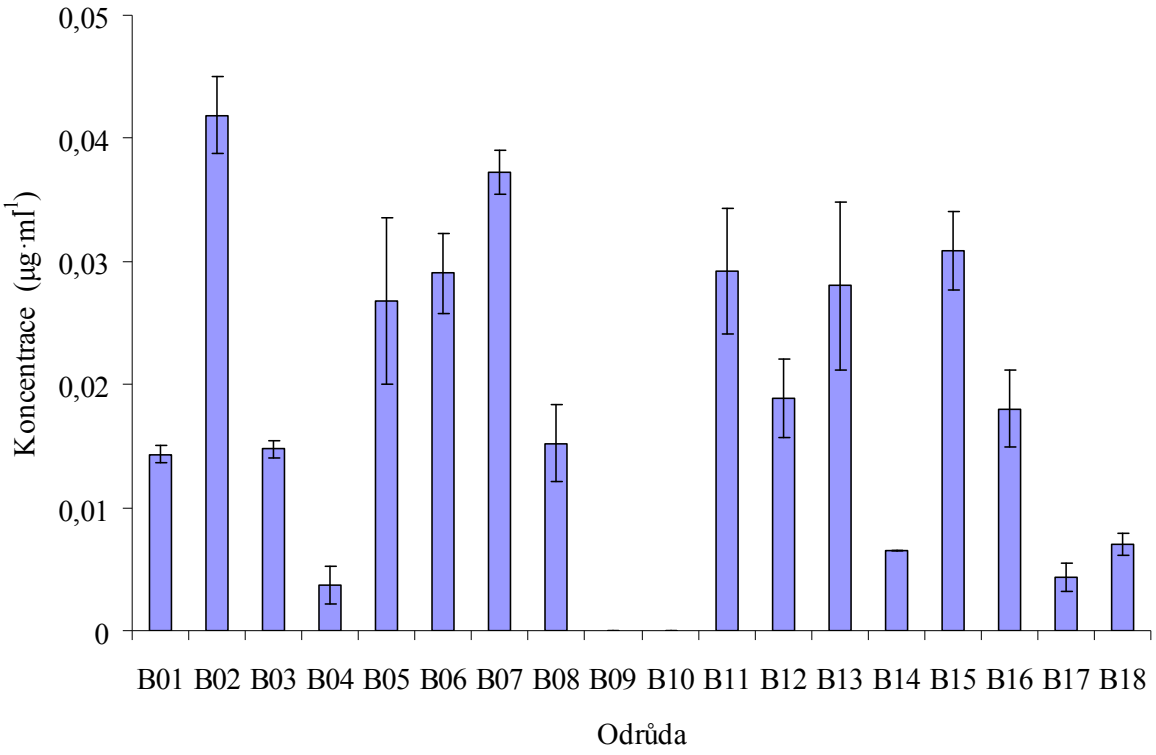
Graf 3: Porovnání celkových koncentrací AAL v jednotlivých vzorcích plodů bezu černého (značení vzorků viz tabulka 4)



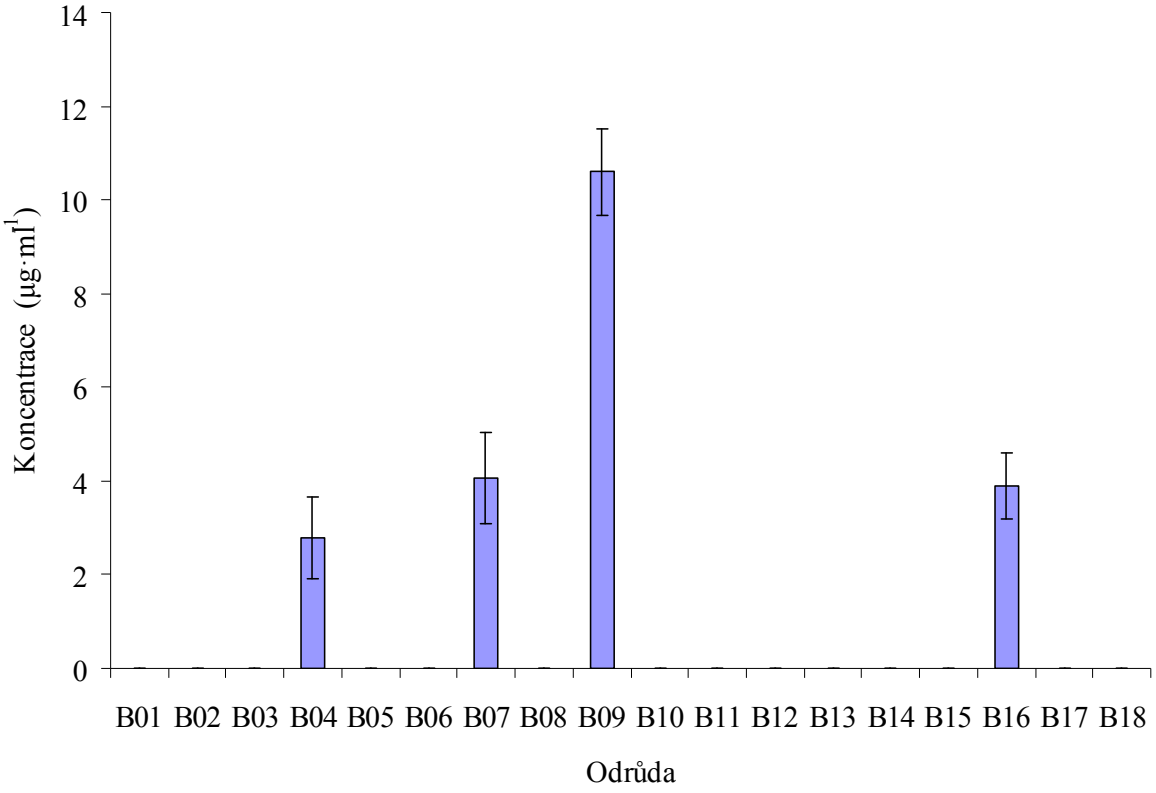
Graf 4: Porovnání obsahu alkoholů v jednotlivých vzorcích plodů bezu černého (značení vzorků viz tabulka 4)



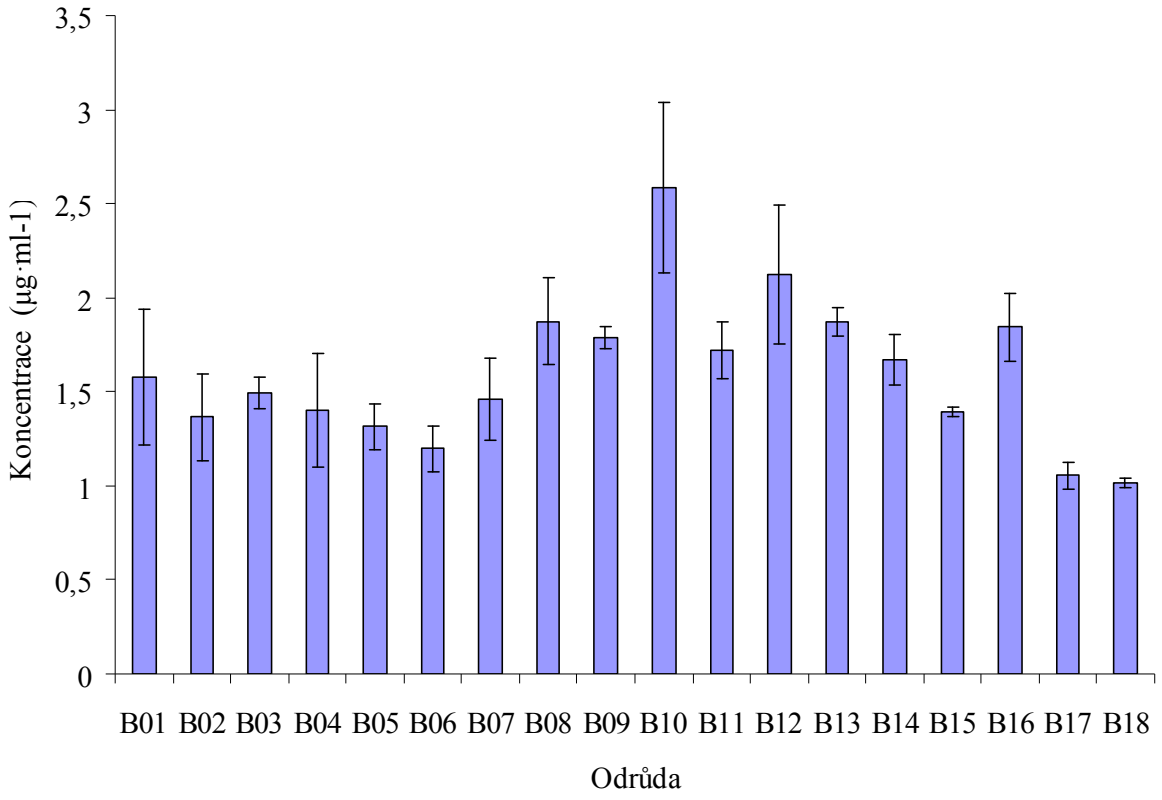
Graf 5: Porovnání obsahu aldehydů v jednotlivých vzorcích plodů bezu černého (značení vzorků viz tabulka 4)



Graf 6: Porovnání obsahu esterů v jednotlivých vzorcích plodů bezu černého (značení vzorků viz tabulka 4)



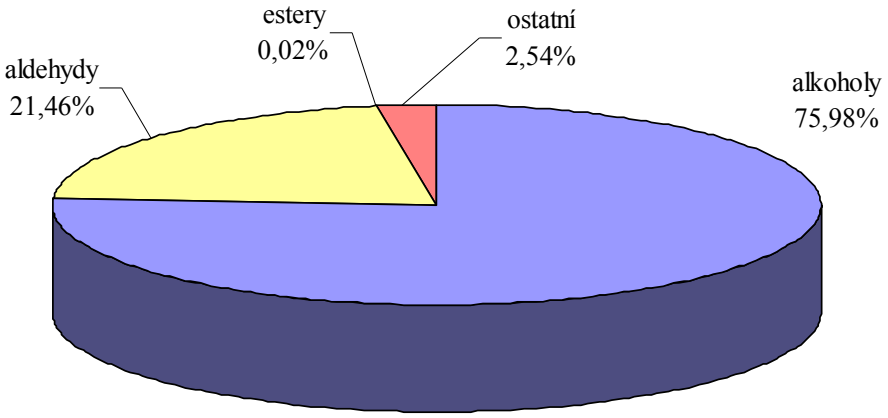
Graf 7: Porovnání obsahu kyseliny octové v jednotlivých vzorcích plodů bezu černého (značení vzorků viz tabulka 4)



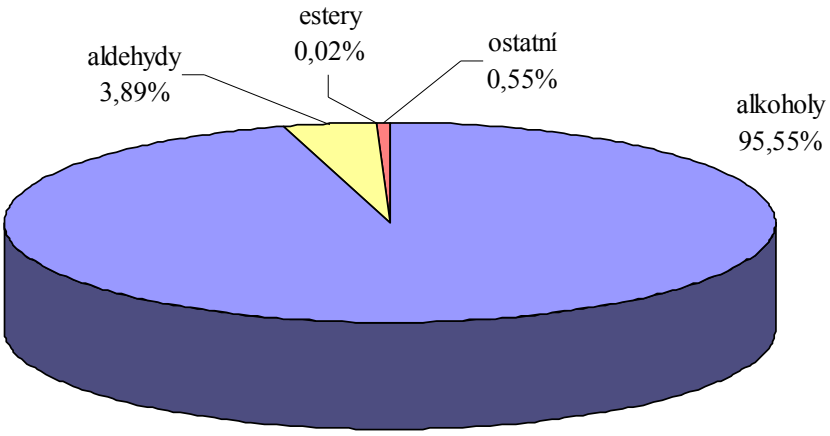
Graf 8: Porovnání celkového obsahu β-damascenonu a linaloolu ve vzorcích plodů bezu černého (značení vzorků viz tabulka 4)

4.1.4. Procentuální zastoupení skupin AAL ve vzorcích

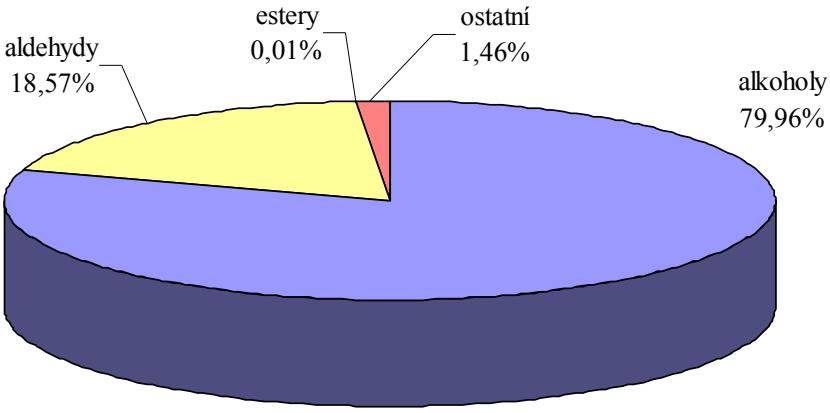
Procentuální zastoupení skupin AAL stanovených v jednotlivých vzorcích plodů udávají grafy 9 až 26. Z uvedených výsledků vyplývá, že k aromatickému profilu bezových šťáv nejvíce přispívají alkoholy (76 až 93 %). Aldehydy tvořily 1,3 až 29,5 %. Estery se vyskytovaly v minimálním množství (pod 0,1 %), avšak je třeba mít na paměti, že i nízká koncentrace esterů může značným způsobem ovlivnit výslednou vůni, kterou člověk vnímá. Z kyselin byla identifikována pouze kyselina octová a to jen ve čtyřech odrůdách, kde tvořila 1,8 až 4,1 % z celkové koncentrace AAL. Nejnižší podíl měla skupina pojmenovaná „ostatní“, do které byly zařazeny β-damascenon a linalool, což jsou látky, jak již bylo zmíněno, mající velký význam pro charakteristické aroma bezu [25-28].



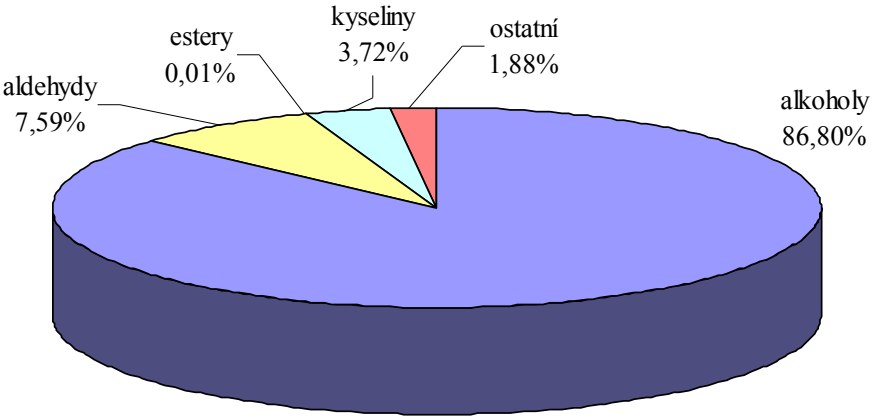
Graf 9: Procentuální zastoupení skupin AAL stanovených ve vzorku B01 – Haschberg



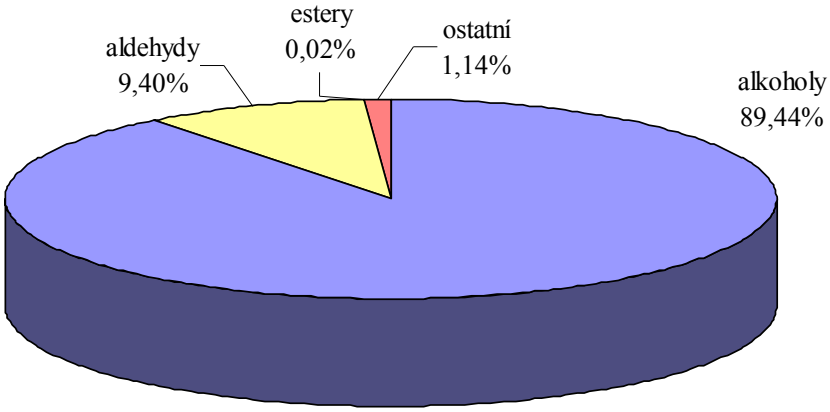
Graf 10: Procentuální zastoupení skupin AAL stanovených ve vzorku B02 – Samdal



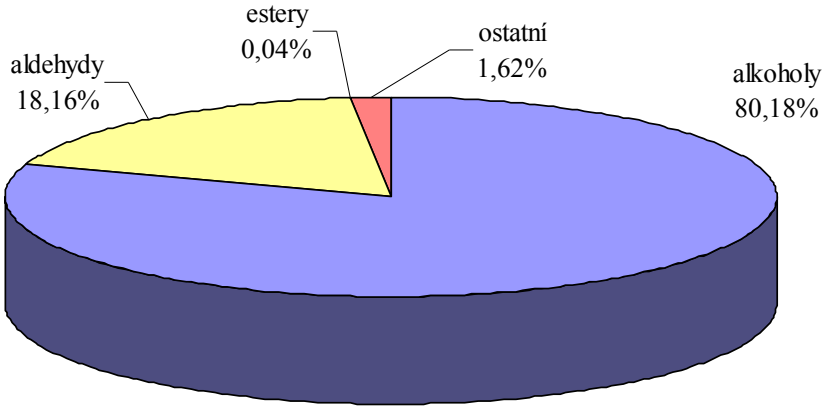
Graf 11: Procentuální zastoupení skupin AAL stanovených ve vzorku B03 – Aurea



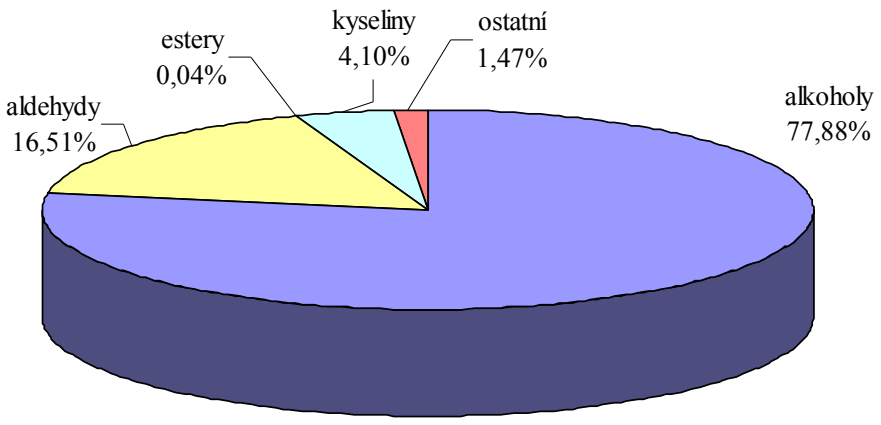
Graf 12: Procentuální zastoupení skupin AAL stanovených ve vzorku B04 - Mammut



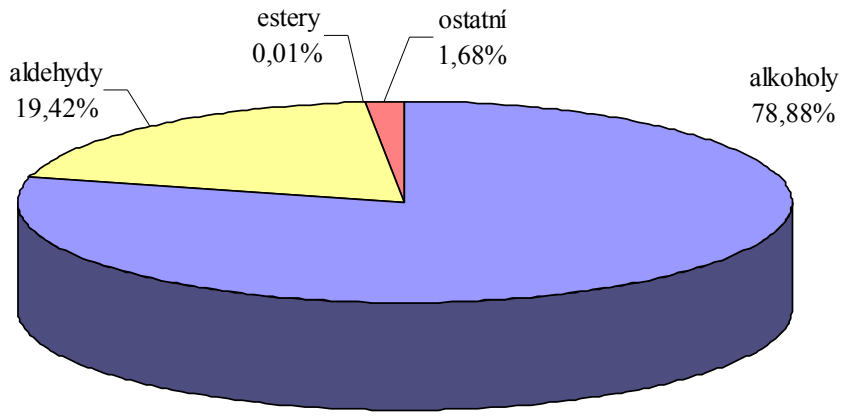
Graf 13: Procentuální zastoupení skupin AAL stanovených ve vzorku B05 – Körsör



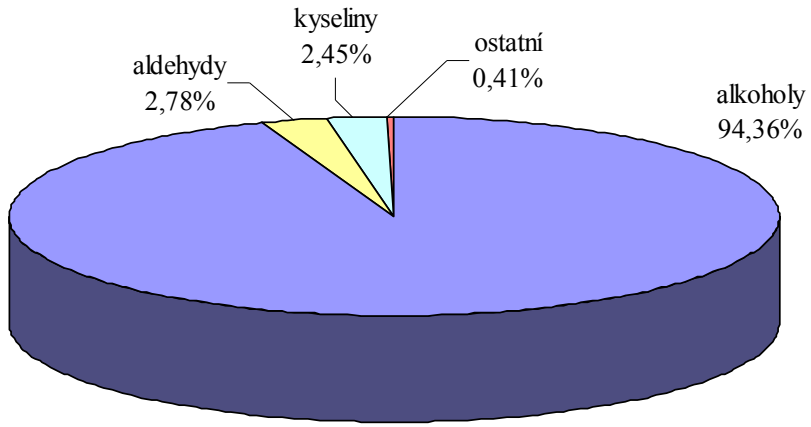
Graf 14: Procentuální zastoupení skupin AAL stanovených ve vzorku B06 – Pregarten



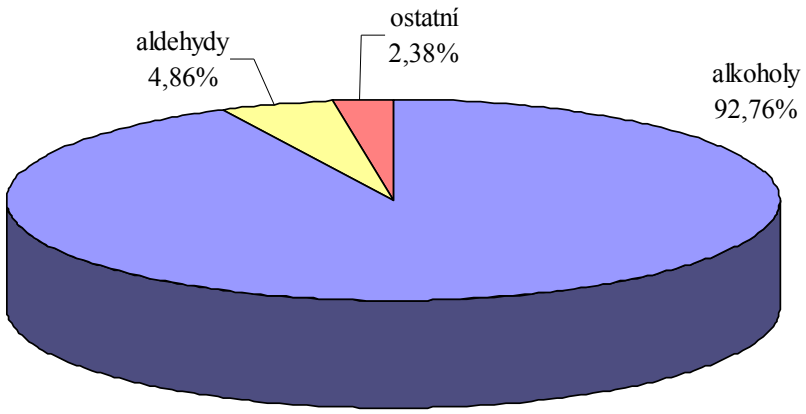
Graf 15: Procentuální zastoupení skupin AAL stanovených ve vzorku B07 – Weihenstephan



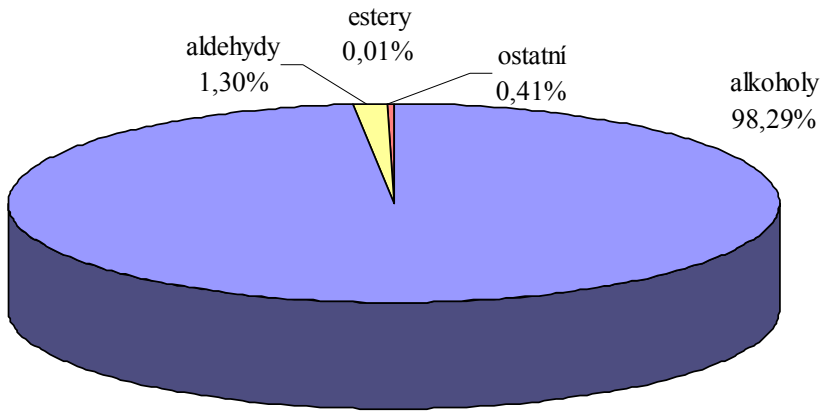
Graf 16: Procentuální zastoupení skupin AAL stanovených ve vzorku B08 - Planý bez



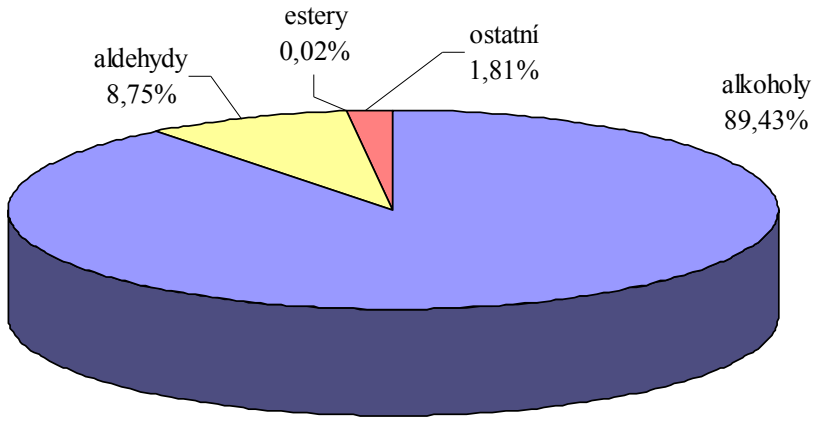
Graf 17: Procentuální zastoupení skupin AAL stanovených ve vzorku B09 – Allesö



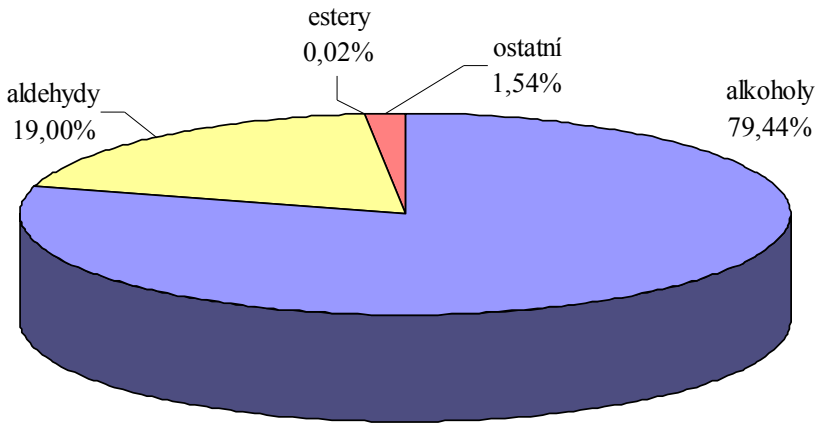
Graf 18: Procentuální zastoupení skupin AAL stanovených ve vzorku B10 - Riese aus Voßloch



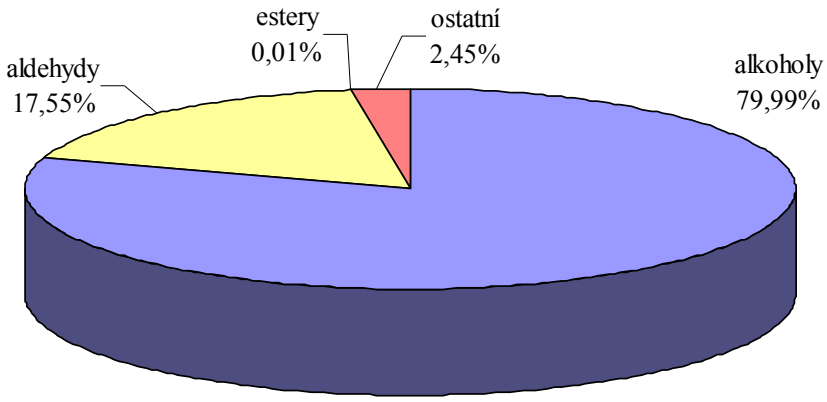
Graf 19: Procentuální zastoupení skupin AAL stanovených ve vzorku B11 – Sambu



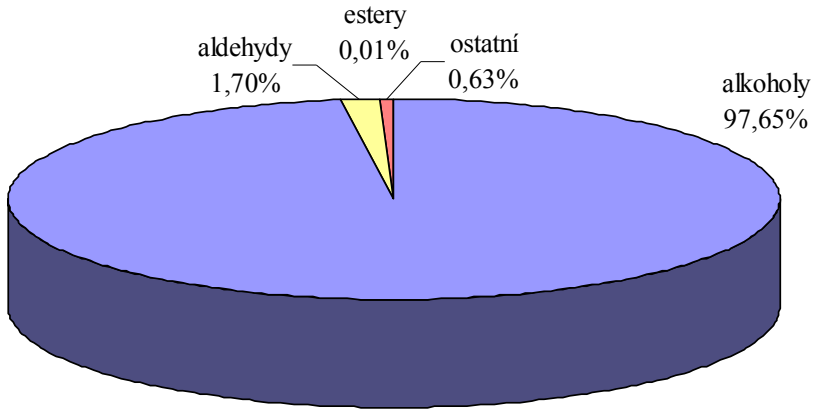
Graf 20: Procentuální zastoupení skupin AAL stanovených ve vzorku B12 – Sambo



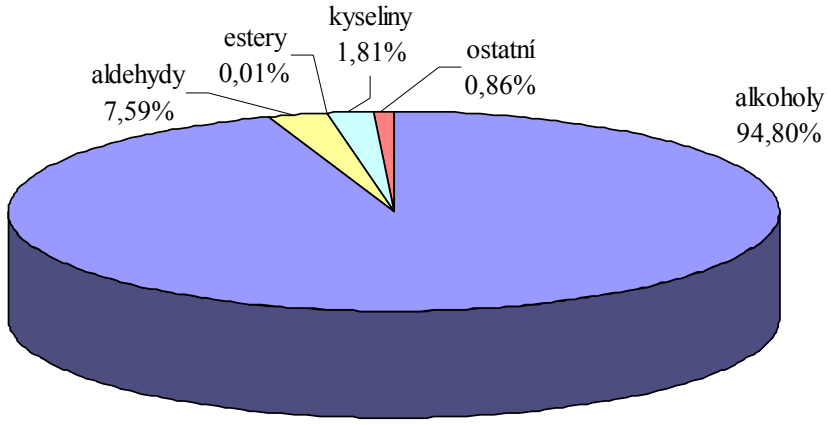
Graf 21: Procentuální zastoupení skupin AAL stanovených ve vzorku B13 – Albida



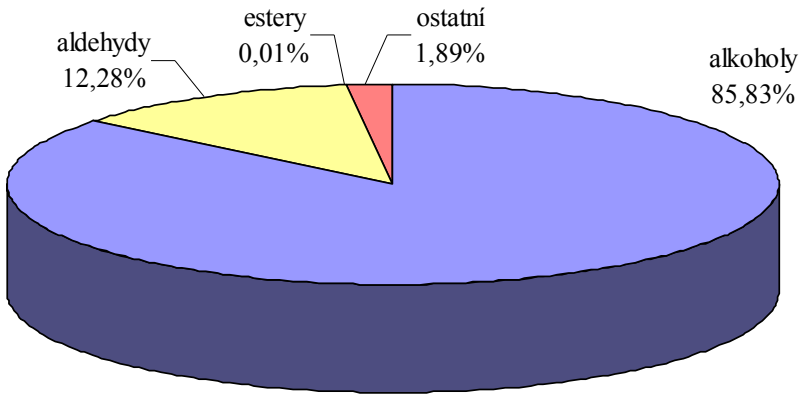
Graf 22: Procentuální zastoupení skupin AAL stanovených ve vzorku B14 – Bohatka



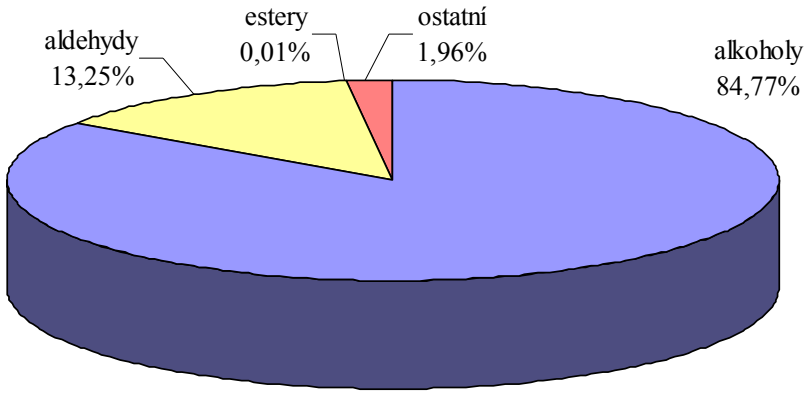
Graf 23: Procentuální zastoupení skupin AAL stanovených ve vzorku B15 – Sampo



Graf 24: Procentuální zastoupení skupin AAL stanovených ve vzorku B16 – Samyl



Graf 25: Procentuální zastoupení skupin AAL stanovených ve vzorku B17 – Heidegg



Graf 26: Procentuální zastoupení skupin AAL stanovených ve vzorku B18 – Dana

4.2. Stanovení vitaminu C

4.2.1. Sestrojení kalibrační závislosti

Každý den byly před samotnými experimenty připraveny čerstvé standardní roztoky a byla proměřena kalibrační křivka. Z hodnot ploch píků pro jednotlivé koncentrace roztoků kyseliny askorbové byly vypočítány průměry (n=3). Poté byla vytvořena závislost těchto hodnot na koncentraci a byla zjištěna rovnice regrese včetně regresního koeficientu (R^2), viz tabulka 16. Do rovnice regrese byla dosazena naměřené hodnota plochy píku (y) a byla vypočtena koncentrace AA (x) ve zkoumaných vzorcích (viz dále a příloha 27).

Tabulka 16: Kalibrační závislosti

Rovnice regrese	R^2	Platí pro
$y = 58304 \cdot x + 67427$	0,9999	TCEP, DTT, L-cystein – pH 7
$y = 60651 \cdot x - 3828$	1	TCEP, DTT, L-cystein – pH 4
$y = 60251 \cdot x - 17926$	0,9999	B01*, B08*
$y = 63200 \cdot x - 26024$	0,9995	B10*
$y = 62550 \cdot x - 24519$	0,9997	B12*
$y = 60692 \cdot x - 5736$	1	B14*, rakytník

** Značení vzorků viz tabulka 4*

4.2.2. Redukce standardních roztoků DHA na AA při pH 7 (resp. 4)

Podmínky redukce byly zvoleny a upraveny na základě odborné literatury [36, 47-49].

Dle schéma v tabulce 6 v kapitole 3.2.6.4 byl proveden set měření účinnosti redukce DHA na AA pro každé redukční činidlo – DTT, TCEP a L-cystein. Výsledky získané reakcí při pH 7 shrnují tabulky 17, 18 a 19, při pH 4 tabulky 20, 21 a 22. Způsob výpočtu jednotlivých hodnot uvedených v tabulkách viz níže. Směs AA a redukčního činidla sloužila pro kontrolu správnosti měření. Retenční čas kyseliny askorbové byl 2,1 minut.

Příklady chromatogramů jsou uvedeny v příloze 20.

Tabulka 17: Redukce standardních roztoků pomocí DTT (5 mg·ml^{-1}) při pH 7

Látka	Roztok	Plocha píku[a] (µV·s)	Sm.od. (%)	Naměř. c (mg·l^{-1})	Teor. c (mg·l^{-1})	Rel. teor. c (-)	Rel. nam. c (-)	Účinnost redukce (%)	Průměr (%)
-	blank	-	-	-	-	-	-	-	-
AA	40 mg·l^{-1}	646196	5,6	9,93	10	-	-	-	-
DHA	A	206311	6,9	2,38	10	-	-	-	-
DHA	B	440697	1,5	6,40	25	2,5	2,69	108	**115**
DHA	C	926162	1,8	14,73	50	2*	2,30	115	
						5	6,18	124	

[a] – průměr hodnot ploch píků (n=3)

Sm.od. – směrodatná odchylka; vypočítána pomocí funkce SMODCH.VÝBĚR v programu MS Excel a převedena na [%]

Naměř. c – naměřená koncentrace (zjištěna z kalibrační křivky – viz tabulka 16) (ředící faktor f = 4)

Teor. c – teoretická koncentrace (více viz kapitola 3.2.5) (ředící faktor f = 4)

Rel. teor. c – relativní teoretická koncentrace; poměr koncentrací roztoků B a C ku A, resp. C ku B (*)

Rel. nam. c – relativní naměřená koncentrace; podíl naměřených koncentrací roztoků B ku A (resp. C/B, C/A).

Účinnost redukce byla zjištěna jako poměr relativní naměřené koncentrace ku relativní teoretické koncentraci a byla vyjádřena v procentech. Poté byl vypočítán průměr těchto hodnot.

Tabulka 18: Redukce standardních roztoků pomocí TCEP (5 mg·ml^{-1}) při pH 7

Látka	Roztok	Plocha píku[a] (µV·s)	Sm.od. (%)	Naměř. c (mg·l^{-1})	Teor. c (mg·l^{-1})	Rel. teor. c (-)	Rel. nam. c (-)	Účinnost redukce (%)	Průměr (%)
-	blank	-	-	-	-	-	-	-	-
AA	40 mg·l^{-1}	596516	2,5	9,07	10	-	-	-	-
DHA	A	222805	2,3	2,66	10	-	-	-	-
DHA	B	474321	1,7	6,98	25	2,5	2,62	105	**109**
DHA	C	956290	1,5	15,25	50	2*	2,18	109	
						5	5,72	114	

Poznámka: Vysvětlivky viz tabulka 17.

Tabulka 19: Redukce standardních roztoků pomocí L-cysteinu (20 mg·ml^{-1}) při pH 7

Látka	Roztok	Plocha píku[a] (µV·s)	Sm.od. (%)	Naměř. c (mg·l^{-1})	Teor. c (mg·l^{-1})	Rel. teor. c (-)	Rel. nam. c (-)	Účinnost redukce (%)	Průměr (%)
-	blank	-	-	-	-	-	-	-	-
AA	40 mg·l^{-1}	593745	3,8	9,03	10	-	-	-	-
DHA	A	202933	2,0	2,32	10	-	-	-	-
DHA	B	442821	0,6	6,44	25	2,5	2,77	111	**119**
DHA	C	938955	0,6	14,95	50	2*	2,32	116	
						5	6,43	129	

Poznámka: Vysvětlivky viz tabulka 17.

Tabulka 20: Redukce standardních roztoků pomocí DTT (5 mg·ml^{-1}) při pH 4

Látka	Roztok	Plocha píku[a] (µV·s)	Sm.od. (%)	Naměř. c (mg·l^{-1})	Teor. c (mg·l^{-1})	Rel. teor. c (-)	Rel. nam. c (-)	Účinnost redukce (%)	Průměr (%)
-	blank	-	-	-	-	-	-	-	-
AA	40 mg·l^{-1}	599241	0,8	9,94	10	-	-	-	-
DHA	A	166334	1,9	2,81	10	-	-	-	-
DHA	B	395921	4,8	6,59	25	2,5	2,35	94	**86**
DHA	C	677339	13,3	11,23	50	2*	1,70	85	
						5	4,00	80	

Poznámka: Vysvětlivky viz tabulka 17.

Tabulka 21: Redukce standardních roztoků pomocí TCEP (5 mg·ml^{-1}) při pH 4

Látka	Roztok	Plocha píku[a] (µV·s)	Sm.od. (%)	Naměř. c (mg·l^{-1})	Teor. c (mg·l^{-1})	Rel. teor. c (-)	Rel. nam. c (-)	Účinnost redukce (%)	Průměr (%)
-	blank	-	-	-	-	-	-	-	-
AA	40 mg·l^{-1}	583991	1,5	9,69	10	-	-	-	-
DHA	A	177528	3,5	2,99	10	-	-	-	-
DHA	B	449626	1,3	7,48	25	2,5	2,50	100	**101**
DHA	C	911746	0,5	15,10	50	2*	2,02	101	
						5	5,05	101	

Poznámka: Vysvětlivky viz tabulka 17.

Tabulka 22: Redukce standardních roztoků pomocí L-cysteinu (20 mg·ml^{-1}) při pH 4

Látka	Roztok	Plocha píku[a] (µV·s)	Sm.od. (%)	Naměř. c (mg·l^{-1})	Teor. c (mg·l^{-1})	Rel. teor. c (-)	Rel. nam. c (-)	Účinnost redukce (%)	Průměr (%)
-	blank	-	-	-	-	-	-	-	-
AA	40 mg·l^{-1}	612060	9,1	10,15	10	-	-	-	-
DHA	A	14989	27,4	0,31	10	-	-	-	-
DHA	B	34728	2,3	0,64	25	2,5	2,05	82	**83**
DHA	C	66436	3,3	1,16	50	2*	1,82	91	
						5	3,73	75	

Poznámka: Vysvětlivky viz tabulka 17.

Na základě měření blanku (roztoku neobsahujícího AA ani DHA) bylo prokázáno, že redukční činidla a další složky směsi (KOH, MPA) nemají stejný retenční čas jako AA (2,1 min). Tím byla vyloučena koeluce AA s látkami směsi. Zda je eluce ovlivněna dalšími faktory (odlišná koncentrace redukčních činidel, čas redukce) by mohlo být předmětem dalších experimentů.

Redukční činidla mají odlišné vlastnosti a vykazují tedy i jiné chování, mají jiné absorpční vlastnosti při dané vlnové délce (254 nm). Stanovení účinnosti redukce bylo v některých případech zatíženo pozitivní chybou.

Nižší účinnost redukce DTT ve srovnání s TCEP při pH 4 [49] byla potvrzena (86 % < 101 %).

Jako nejvhodnější redukční činidlo bylo vybráno TCEP při pH 4, jelikož se jeho účinnost redukce nejvíce blížila 100 % s nejmenší odchylkou.

4.2.3. Stanovení AA v reálných vzorcích

Obsah kyseliny askorbové byl stanoven jak v samotném extraktu (bez jakýchkoli úprav), tak v extraktu s přídavkem roztoků KOH a MPA ve stejném poměru jako u vzorků pro redukci DHA na AA. Koncentrace se lišila jen minimálně (viz tabulka 23), velikost směrodatné odchylky byla akceptovatelná.

Tabulka 23: Koncentrace kyseliny askorbové ve 100 g plodů bezu černého stanovené v čistém extraktu (a) a extraktu ve směsi s KOH a MPA (1:1:2) (b)

Označení	Odrůda	AA (mg·100 g^{-1})		
		a	b	Průměr ± sm.odch.
B01	Haschberg	1,08	1,07	1,07 ± 0,00
B08	Planý bez	0,76	0,86	0,81 ± 0,05
B10	Riese aus Vobloch	1,26	1,51	1,39 ± 0,13
B12	Sambo	5,71	5,47	5,59 ± 0,12
B14	Bohatka	1,40	1,51	1,46 ± 0,06

4.2.4. Redukce DHA na AA v reálných vzorcích

Na základě výsledků měření účinnosti jednotlivých redukčních činidel (viz výše) bylo na reálné vzorky aplikováno TCEP při pH 4.

Stanovené množství vitaminu C udává tabulka 24. Koncentrace DHA byla vypočítána jako rozdíl koncentrace AA stanovené ve vzorku po redukci a před redukcí. Nejvyšší celkový obsah kyseliny askorbové byl stanoven v odrůdě Sambo (13 mg·100 g^{-1}), nejnižší v Riese aus Vobloch (5,1 mg·100 g^{-1}). Planý bez obsahoval přibližně stejné množství AA jako ostatní zkoumané odrůdy (5,5 mg·100 g^{-1}).

Hodnoty celkového obsahu kyseliny askorbové odpovídají koncentracím uvedeným v literatuře, tedy rozmezí 6 – 37 mg·100 g^{-1} [15, 18, 53], u některých odrůd byl obsah mírně nižší.

Koncentrace samotné kyseliny dehydroaskorbové v plodech bezu však není z předchozích prací známa, a tudíž ji není možné porovnat. Námi stanovené množství DHA ve vzorcích bylo výrazně vyšší než množství AA, což není obvyklé, srovnáme-li poměr jejich koncentrací v jiných druzích ovoce, například ve zralých banánech (6,00 mg AA ve 100 g; 0,61 mg DHA ve 100 g), mangu (54 mg AA ve 100 g; 6 mg DHA ve 100 g) [37] či v jahodách (57,2 mg AA ve 100 g; 2,2 mg DHA ve 100 g) [48].

Tabulka 24: Celkový obsah vitaminu C, kyseliny askorbové (AA) a dehydroaskorbové (DHA) v plodech bezu černého (vztaženo na 100 g plodů)

Označení	Odrůda	Celkový vit C (mg·100 g^{-1})	AA (mg·100 g^{-1})	DHA (mg·100 g^{-1})
B01	Haschberg	5,6	1,1	4,5
B08	Planý bez	5,5	0,8	4,6
B10	Riese aus Vobloch	5,1	1,4	3,8
B12	Sambo	13,0	5,6	7,4
B14	Bohatka	6,1	1,5	4,6

Pro ověření postupu redukce bylo provedeno kontrolní stanovení na jiné matrici - plodech rakytníku, u něhož byla určena koncentrace AA v dřívějším výzkumu [67]. Stanoven byl obsah 252 mg AA na 100 g v extraktu před redukcí, po redukci na 247 mg·100 g^{-1}. Rozdíl 5 mg·100 g^{-1} odpovídá 2 % z celkového množství, tuto odchylku lze zahrnout do nepřesnosti způsobené přípravou roztoků. Stanovená koncentrace AA odpovídá dříve zjištěné [67].

Výsledky poukazující na přítomnost většího množství DHA v plodech bezu mohly být ovlivněny složitou povahou vzorků. Plody bezu obsahují mnoho látek absorbujících při 254 nm, které mohou znesnadňovat kvantifikaci kyseliny askorbové. Použitá metoda pro stanovení AA je vhodná spíše pro jiný typ matrice, což bylo prokázáno u plodů rakytníku. Pro analýzu plodů bezu by bylo vhodné v dalších experimentech zařadit a optimalizovat přečišťovací krok (SPE) nebo vyvinout metodu, u které bude rozlišení mezi AA a ostatními neidentifikovanými píky větší. Není také vyloučeno, že dochází k interferencím redukčního činidla s dalšími složkami matrice.

Metoda pro redukci DHA na AA v plodech bezu černého, aplikovaná v této diplomové práci, je součástí počátečních experimentů na dané téma. Postup a podmínky redukce by bylo vhodné podrobit další optimalizaci.

Příklady chromatogramů, kalibrační závislosti, naměřené plochy píků, koncentrace AA, další dílčí výpočty a hodnoty stanovené v extraktech bezu černého i rakytníku jsou uvedeny v přílohách 21 až 27.

5. ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývá charakterizací plodů bezu černého (*Sambucus nigra L.*). S přihlédnutím k experimentálnímu vybavení pracoviště byly jako sledované parametry zvoleny aromaticky aktivní látky a vitamin C. Teoretická část stručně informuje o vlastnostech, léčivých účincích, možnostech zpracování a chemickém složení bezu černého. Dále se zaměřuje na aromaticky aktivní látky a vitamin C. Zmíněny jsou metody vhodné pro jejich stanovení.

Cílem experimentální části bylo stanovit aromatický profil a celkový obsah vitaminu C v plodech vybraných odrůd bezu černého.

Aromatický profil byl stanoven pomocí SPME-GC-FID. Tato metoda byla aplikována na 17 různých šlechtěných odrůd a bez planý. Celkem bylo identifikováno a kvantifikováno 24 odlišných těkavých aromaticky aktivních látek, z nich 12 alkoholů, 5 aldehydů, 4 estery, 1 kyselina a 2 „jiné“ sloučeniny (linalool a β-damascenon). Ve vzorcích plodů nebyl nalezen žádný keton. Složení jednotlivých vzorků se lišilo, žádný z nich neobsahoval všechny identifikované látky současně. Mezi jednotlivými odrůdami byly nalezeny značné rozdíly.

Jednotlivé odrůdy byly srovnány s planým bezem za účelem zjištění, zda má šlechtění vliv na obsah AAL. Navzdory očekávání ve většině šlechtěných odrůd nebyl nalezen výrazně vyšší obsah AAL než v planém bezu. Nejvyšší celkovou koncentraci AAL měly odrůdy Allesö a Sambu. Zhruba čtyřnásobně nižší byla stanovena u planého bezu. Naopak odrůdy Heidegg a Dana měly celkovou koncentraci cca poloviční oproti planému bezu.

Nejvíce různých AAL bylo identifikováno v odrůdě Sambo (B12), celkem 21, poté v jediné bílé odrůdě Albida (B13), celkem 20. U planého bezu bylo nalezeno 17 AAL. Počet AAL u ostatních odrůd se pohyboval v rozmezí 15 – 19.

Hlavní složkou všech vzorků byly alkoholy, nejvíce jich bylo přítomno v odrůdě Sambu (B11) - 98 %, nejméně v odrůdě Haschberg (B01) - 76 %. V nejvyšších koncentracích se vyskytoval methanol a ethanol.

Obsah aldehydů byl velmi proměnlivý, pohyboval se v rozmezí 3,74 až 23,10 $\mu g \cdot g^{-1}$. Celkově tvořily 1,3 až 29,5 %. Planý bez obsahoval druhou nejvyšší koncentraci (21,63 ± 2,56 $\mu g \cdot g^{-1}$). Z kvantitativního hlediska byl nejvýznamnější acetaldehyd.

Estery se vyskytovaly v minimálním množství (pod 0,1 %), přesto mohou mít značný vliv na senzorické vlastnosti. Jejich obsah v planém bezu byl průměrný (15,22 ± 2,76 $ng \cdot g^{-1}$). Ve dvou odrůdách, B09 a B10, nebyly identifikovány žádné estery.

Kyselina octová byla jedinou nalezenou kyselinou, stanovená byla pouze ve čtyřech odrůdách. Tvořila zde 1,8 až 4,1 % z celkové koncentrace AAL.

β-damascenon a linalool byly sledovány samostatně, jelikož primárně zodpovídají za charakteristické aroma bezu [25-28]. Jejich koncentrace se mezi odrůdami lišila jen minimálně, pohybovala se v rozmezí 1,0 – 2,6 $\mu g \cdot g^{-1}$, planý bez obsahoval 1,5 $\mu g \cdot g^{-1}$ těchto látek. Nejvyšší koncentrace byla nalezena u odrůdy Riese aus Voβloch.

Všechny identifikované látky již byly dříve nalezeny v plodech či květech bezu černého [25-28, 30].

Podrobnější výsledky a podstatně vyšší počet identifikovaných sloučenin by mohla přinést analýza GC ve spojení s hmotnostní detekcí (GC-MS), ta je ovšem nákladnější a časově náročnější.

Pro stanovení celkového obsahu vitaminu C byla použita metoda HPLC. Nejprve bylo potřeba nalézt vhodné činidlo pro redukci DHA na AA za vhodného pH. Srovnávána byla tři redukční činidla (TCEP, DTT, L-cystein) při dvou různých pH (4 a 7). Analýza byla provedena s roztoky standardů AA a DHA. Srovnáním účinností redukce činidel bylo zvoleno za optimální TCEP při pH 4 (účinnost redukce 101 %). Tyto podmínky byly následně aplikovány na plody 5 vybraných odrůd bezu černého.

Stanovená celková koncentrace vitaminu C (součet AA a DHA) se pohybovala v rozpětí 5,1 – 13,0 mg na 100 g plodů. Tyto hodnoty odpovídají koncentracím uváděným v literatuře [18, 53]. Nejvyšší celkový obsah kyseliny askorbové byl stanoven v odrůdě Sambo, nejnižší v Riese aus Vobloch. Planý bez obsahoval přibližně stejné množství AA jako ostatní zkoumané odrůdy.

Uvedená data jsou důležitá jak pro spotřebitele, kteří chtějí kupovat produkty nejvyšší jakosti, tak i pro producenty, kteří chtějí ve velkém množství pěstovat vysoce kvalitní odrůdy, aby mohli dosáhnout vyšší přidané hodnoty při komercializaci tohoto ovoce.

Vylepšení nutričních hodnot výrobků z černého bezu by mohlo být dosaženo výběrem kultivarů s vysokým obsahem kyseliny askorbové.

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

[1] HEMGESBERG, Hanspeter. *Černý bez a naše zdraví: květy, listy a plody černého bezu léčí všechny potíže*. Olomouc: Fontána, 2002, 158 s. ISBN 80-86179-98-2.

[2] LIM, Tong Kwee. *Edible medicinal and non-medicinal plants*. New York: Springer, c2012-, v. <1-3>. ISBN 978-90-481-8660-0.

[3] JANČA, Jiří. *Herbář léčivých rostlin: 1. díl* 1. vyd. Praha: EMINENT, 1994, 288 s. ISBN 80-85876-02-7.

[4] MEZERA, Alois. *Naše stromy a keře*. 2., přeprac. vyd. Ilustrace Květoslav Hísek. Praha: Albatros, 1989. 426 s. Oko, sv. 25. ISBN 13-907-89.

[5] KOTHE, H. *1000 bylin*. České vyd. 1. Praha: Svojtka & Co, 2007. 336 s. ISBN 978-80-7352-667-2.

[6] Bez černý – keř. *foto-tapety.cz* [online]. 2013 [cit. 2014-02-02]. Dostupné z: <http://www.foto-tapety.cz/image1.php?uid=32&iid=531&nv=2&sz=1>

[7] VĚTVIČKA, Václav. *Stromy a keře*. 2. vyd. Praha: Aventinum, 2001, 288 s. ISBN 80-715-1178-1.

[8] PAMPLONA-ROGER, Jorge D. *Encyklopedie léčivých rostlin*. Vyd. 1. Praha: Advent-Orion, 2008. 385 s. ISBN 978-807-1721-192.

[9] Sambucus nigra. *Wikimedia Commons* [online]. 2009-05-17 [cit. 2014-02-03]. Dostupné z: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sambucus_nigra_0002.JPG>

[10] KORBELÁŘ, Jaroslav, ENDRIS, Zdeněk. *Naše rostliny v lékařství*. Ilustroval Jindřich Krejča. 7. vyd. Praha: Avicenum, 1981. 504 s.

[11] HEINERMAN, John. *Encyklopedie léčivých šťáv*. Přeložila Jaroslava Kočová. Praha: PRAGMA, 1994. 360 s. ISBN 80-720-5691-3.

[12] Sambucus nigra. *Wikimedia Commons* [online]. 2009-07-29 [cit. 2014-02-03]. Dostupné z: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sambucus_nigra_0004.JPG>

[13] *Fiftyfifty.cz* [online]. 2007-05-30 [cit. 2012-02-04]. Dostupné z: <http://www.fiftyfifty.cz/Bez-cerny-ker-ktery-leci-a-cisti-2754020.php>

[14] VÁŇA, Pavel. *Léčivé stromy a keře podle bylináře Pavla*. Praha: Eminent, 2006, 153 s. ISBN 80-728-1224-6.

[15] ERCISLI, S., TOSUN, M., AKBULUT, M., . Physico-chemical characteristics of some wild grown European elderberry (Sambucus nigra L.) genotypes. *Pharmacognosy Magazine*. 2009, vol. 5, issue 20, s. 320-323. DOI: http://dx.doi.org/10.4103/0973-1296.58153.

[16] VELÍŠEK, Jan, HAJŠLOVÁ, Jana. *Chemie potravin 1*. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. 580 s. ISBN 978-80-86659-15-2.

[17] VEBERIC, R., et al. European elderberry (Sambucus nigra L.) rich in sugar organic acids, anthocyanins and selected polyphenols. *Food chemistry*, 2009, vol. 114, issue 2, s. 511–515. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.080.

[18] KAACK, K., AUSTED, T. Interaction of vitamin C and flavonoids in elderberry (Sambucus nigra L.) during juice processing. *Plant Foods for Human Nutritions*, 1998, 52, s. 187–198. DOI: 10.1023/A:1008069422202

[19] VŠCHT. *Látky vonné a chuťové* [online]. 2014 [cit. 2014-03-30]. Dostupné z: <http://web.vscht.cz/~koplikr/L%C3%A1tky%20vonn%C3%A9%20a%20chu%C5%A5ov%C3%A9.pdf>

[20] VŠCHT. [online]. 2014 [cit. 2014-03-30]. Dostupné z: <http://www.vscht.cz/zkp/ustav/skripta/AP/02/AP_10.pdf>
[21] PLUTOWSKA, B., WARDENCKI, W. Aromagrams – Aromatic profiles in the appreciation of food quality. *Food Chemistry*. 2007, vol. 101, issue 2, s. 845-872. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.12.028. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814606000124>
[22] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 2*. 1. vyd. Tábor: OSSIS, 2002. 303 s. ISBN 80-902391-2-9.
[23] D'ACAMPORA ZELLNER, B., et al. Gas chromatography–olfactometry in food flavour analysis. *Journal of Chromatography A*. 2008, vol. 1186, 1-2, s. 123-143. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.09.006. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967307015506>
[24] BALDWIN, Ian T. Plant volatiles. *Current Biology*. 2010, vol. 20, issue 9, R392-R397. DOI: 10.1016/j.cub.2010.02.052. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982210002411
[25] KAACK, K., et al. The relationship between sensory quality and volatile compounds in raw juice processed from elderberries (Sambucus nigra L.). *European Food Research and Technology*, 2005, vol. 221, 3-4, s. 244–254. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/s00217-005-1141-4.
[26] JENSEN, K., et al. Olfactory and quantitative analysis of volatiles in elderberry (Sambucus nigra L) juice processed from seven cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2001, vol. 81, issue 2, s. 237-244. DOI: http://dx.doi.org/10.1002/1097-0010(20010115)81:2<.
[27] JØRGENSEN, U., et al. Olfactory and Quantitative Analysis of Aroma Compounds in Elder Flower (Sambucus nigra L.) Drink Processed from Five Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000, vol. 48, issue 6, s. 2376-2383. DOI: http://dx.doi.org/10.1021/jf000005f.
[28] KAACK, K., et al. Relationship between sensory quality and volatile compounds of elderflower (Sambucus nigra L.) extracts. *European Food Research and Technology*. 2006, vol. 223, issue 1, s. 57-70. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/s00217-005-0122-y.
[29] WYLLIE, S. G., FELLMAN, J. K. Formation of Volatile Branched Chain Esters in Bananas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000, vol. 48, issue 8, s. 3493-3496. DOI: http://dx.doi.org/10.1021/jf0001841.
[30] TOULEMONDE, B., RICHARD, H. M. Volatile constituents of dry elder (Sambucus nigra L.) flowers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1983, vol. 31, issue 2, s. 365-370. DOI: http://dx.doi.org/10.1021/jf00116a046.
[31] DAVIES, M. B., AUSTIN, J., PARTRIDGE, D. A. *Vitamin C: Its chemismy and biochemistry*. 1.vyd. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1991, s. 1-130. ISBN 0-85186-333-7.
[32] FENNEMA, Owen R. *Food chemistry*. 3. vyd. New York: Marcel Dekker, Inc., 1996. 1069 s. ISBN 0-8247-9691-8.
[33] *Bezpečnostní list – kyselina askorbová E 300* [online]. 2013-05-20 [cit. 2014-01-12]. Dostupné z: <http://www.lach-ner.com/files/50-81-7_Kyselina_askorbova_v2_CZ.pdf>
[34] Wikimedia Commons [online]. 2009-02-07 [cit. 2014-01-12]. Dostupné z: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/11/Ascorbic_acid_isomers.svg>

[35] VELÍŠEK, Jan.: *Chemie potravin 2*. 1.vyd. Tábor: OSSIS, 1999. 328 s. ISBN 80-902391-4-5.
[36] DEUTSCH, J. C. Dehydroascorbic acid. *Journal of chromatography A*. 2000, vol. 881, 1-2, s. 299-307. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9673(00)00166-7.
[37] HERNÁNDEZ, Y., LOBO M.G., GONZÁLEZ M. Determination of vitamin C in tropical fruits: A comparative evaluation of methods. *Food Chemistry*. 2006, 96, s. 654-664. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.04.012
[38] PÁNEK, J., POKORNÝ, J., DOSTÁLOVÁ, J. *Základy výživy a výživová politika*. 1.vyd.. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2002. 219 s. ISBN 80-7080-468-8.
[39] LEDVINA, M., STOKLASOVÁ, A., CERMAN, J. *Biochemie pro studující medicíny II.díl – kapitola 14-23*. 1.vyd. Praha: Univerzita Karlova v Praze – Nakladatelství Karolinum, 2004. s. 547 – 549. ISBN 80-246-0850-2.
[40] Food Additives - CSPI´s Food Safety. [online]. 2014 [cit. 2014-01-28]. Dostupné z: <http://www.cspinet.org/reports/chemcuisine.htm>
[41] KABASAKALIS, V. Ascorbic acid content of commercial fruit juices and its rate of loss upon storage. *Food Chemistry*. 2000, vol. 70, issue 3, s. 325-328. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/s0308-8146(00)00093-5.
[42] KLIMCZAK, I., MAŁECKA, M., SZLACHTA M., GLISZCZYŃSKA-ŚWIGŁO A. Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2007, vol. 20, 3-4, s. 313-322. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2006.02.012.
[43] BREE, I. V., et al. Modelling the degradation kinetics of vitamin C in fruit juice in relation to the initial headspace oxygen concentration. *Food Chemistry*. 2012, vol. 134, issue 1, s. 207-214. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.096.
[44] LEE, H.S., COATES G.A. Vitamin C in frozen, fresh squeezed, unpasteurized, polyethylene-bottled orange juice: a storage study. *Food Chemistry*. 1999, vol. 65, issue 2, s. 165-168. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/s0308-8146(98)00180-0.
[45] STINCO, C. M., et al. Industrial orange juice debittering: Impact on bioactive compounds and nutritional value. *Journal of Food Engineering*. 2013, vol. 116, issue 1, s. 155-161. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.11.009.
[46] *Bezpečnostní list – kyselina dehydroaskorbová* [online]. 2013-03-08 [cit. 2014-03-12]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/261556?lang=en&region=CZ>
[47] WECHTERSBACH, L., CIGIĆ, B. Reduction of dehydroascorbic acid at low pH. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 2007, vol. 70, issue 5, s. 767-772. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.jbbm.2007.04.007.
[48] ODRIOZOLA-SERRANO, I., HERNANDEZ-JOVER, T., MARTIN-BELLOSO, O. Comparative evaluation of UV-HPLC methods and reducing agents to determine vitamin C in fruits. *Food Chemistry*. 2007, vol. 105, issue 3, s. 1151-1158. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.02.037.
[49] LYKKESFELDT, J. Determination of Ascorbic Acid and Dehydroascorbic Acid in Biological Samples by High-Performance Liquid Chromatography Using Subtraction Methods: Reliable Reduction with Tris[2-carboxyethyl]phosphine Hydrochloride. *Analytical Biochemistry*. 2000, vol. 282, issue 1, s. 89-93. DOI: http://dx.doi.org/10.1006/abio.2000.4592.

[50] NOVÁKOVÁ, L., SOLICH P., SOLICHOVÁ, D. HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids: HPLC Method. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2008, vol. 27, issue 10, s. 282-284. DOI: http://dx.doi.org/10.1533/9781845698140.6.282.

[51] ŠTULÍK, K.: *Analytické separační metody*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004. 264 s. ISBN 80-246-0852-9.

[52] SOMMER, L.: *Základy analytické chemie II*. 1. vyd. Brno: VUTIUM, 2000. 347 s. ISBN 80-214-1742-0.

[53] SKREDE, Grete, et al. Variation in quality parameters between and within 14 Nordic tree fruit and berry species. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil*. 2012, vol. 62, issue 3, s. 193-208. DOI: http://dx.doi.org/10.1080/09064710.2011.598543.

[54] NOVÁKOVÁ, L., SOLICHOVÁ D., SOLICH, P. Hydrophilic interaction liquid chromatography – charged aerosol detection as a straightforward solution for simultaneous analysis of ascorbic acid and dehydroascorbic acid. *Journal of Chromatography A*. 2009, vol. 1216, issue 21, s. 4574-4581. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2009.03.060.

[55] SILVA, F. O. Total ascorbic acid determination in fresh squeezed orange juice by gas chromatography. *Food Control*. 2005, vol. 16, issue 1, s. 55-58. DOI: 10.1016/j.foodcont.2003.11.007. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713503001919

[56] ARYA, S.P, MAHAJAN M., JAIN, P.. Non-spectrophotometric methods for the determination of Vitamin C. *Analytica Chimica Acta*. 2000, vol. 417, issue 1, s. 1-14. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/s0003-2670(00)00909-0.

[57] VANDER JAGT, D.J., GARRY, P.J., HUNT, W.C. Ascorbate in Plasma as Measured by Liquid Chromatography and by Dichlorophenolindophenol Colorimetry. *Clinical Chemistry*. 1986, vol. 32, issue 6, s. 1004-6

[58] BURINI, G. Development of a quantitative method for the analysis of total L-ascorbic acid in foods by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2007, vol. 1154, 1-2, s. 97-102. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2007.03.013.

[59] *Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology* [online]. 2012 [cit. 2012-03-10]. Dostupné z: <http://fvhe.vfu.cz/export/sites/fvhe/adresa/sekce_ustavy/uvozp/Teorie_SPME.pdf>

[60] *Sigma-Aldrich* [online]. 2012 [cit. 2012-03-11]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma-Aldrich/General_Information/spme_teorie.Par.0001.File.tmp/spme_teorie.pdf>

[61] KONING, S., JANSSEN, H.-G., BRINKMAN, U. A. The Modern Methods of Sample Preparation for GC Analysis. *Chromatographia*. 2009, 69, s. 33-78.

[62] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2. upravené a doplněné vyd. Ostrava, 2003, 132 s. ISBN 80-86369-07-2.

[63] CHURÁČEK, Jaroslav. *Analytická separace látek*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1990, 384 s. ISBN 80-030-0569-8.

[64] SUCHÁNEK, Miroslav. *Validace analytickych metod.* 1. vyd. Praha: Eurachem - ČR, 1997, 137 s. Kvalimetrie. ISBN 80-901-8682-3.

[65] ASCHEROVÁ, A. *Stanovení vybraných vonných látek v potravinách*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 87 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Eva Vítová, Ph.D.

[66] CHRISTOVOVÁ, S. *Vybrané validační parametry metody stanovení aromatických látek bezu černého* . Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 83 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Eva Vítová, Ph.D.

[67] CETKOVSKÁ, J. *Stanovení vitaminu C kapalinovou chromatografií v plodech jednotlivých odrůd méně známých druhů ovoce.* Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 87 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA	Ascorbic acid (kyselina askorbová)
AAL	Aromaticky aktivní látky
CAD	Corona-charged aerosol detektor (aerosolový detektor nabitých částic)
CAS	Chemical Abstracts Service Registry Number (registrační číslo CAS)
DAD	Diode-array detector (detektor s diodovým polem)
DCPIP	2,6-dichlorofenolindofenol
DHA	Dehydroascorbic acid (kyselina dehydroaskorbová)
DTT	Dithiothreitol
FID	Flame ionization detector (plamenový ionizační detektor)
FD	Fluorescenční detekce
GC	Gas chromatography (plynová chromatografie)
GC-FID	Gas chromatography-flame ionization detector (plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem)
GC-MS	Gas chromatography-mass spectrometry (plynová chromatografie s hmotnostní detekcí)
HS-SPME	Headspace solid-phase microextraction (Headspace mikroextrakce tuhou fází)
HILIC	Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (hydrofilní interakční chromatografie)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)
LDL	Low Density Lipoproteins (nízkohustotní lipoproteiny)
MPA	Kyselina monohydrogenfosforečná
MS	Mass spectrometry (hmotnostní spektrometrie)
NADH	Redukovaná forma nikotiamidadenindinukleotidu
NADPH	Redukovaná forma nikotiamidadenindinukleotidfosfátu
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (nukleární magnetická rezonance)
NP-HPLC	Normal Phase HPLC (HPLC s normální fází)
PE	Polyethylen
PEEK	Polyetheretherketon
PS	Polystyren
PS-DVB	poly(styren-divinylbenzen)
RP-HPLC	Reverse Phase HPLC (HPLC s reverzní fází, na nepolárních adsorbentech)
TCEP	Tris-(2-karboxyethyl)fosfin
UV	Ultraviolet (ultrafialový)
SPE	Solid-phase extraction (extrakce tuhou fází)
SPME	Solid-phase microextraction (mikroextrakce tuhou fází)

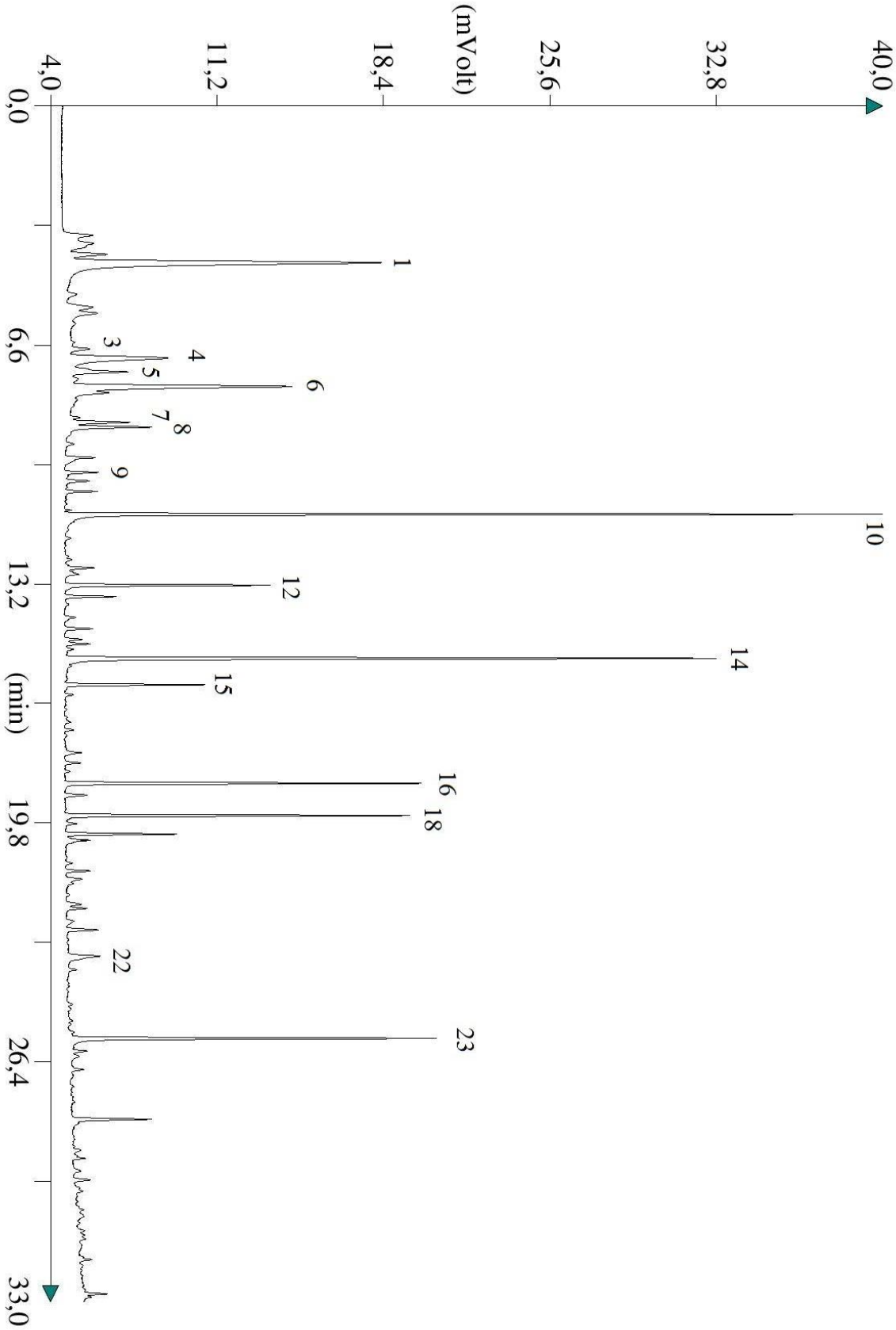
8. SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Legenda k chromatogramům
Příloha 2: Chromatogram identifikovaných AAL – Haschberg (B01)
Příloha 3: Chromatogram identifikovaných AAL – Samdal (B02)
Příloha 4: Chromatogram identifikovaných AAL – Aurea (B03)
Příloha 5: Chromatogram identifikovaných AAL – Mammut (B04)
Příloha 6: Chromatogram identifikovaných AAL – Körsör (B05)
Příloha 7: Chromatogram identifikovaných AAL – Pregarten (B06)
Příloha 8: Chromatogram identifikovaných AAL – Weihenstephan (B07)
Příloha 9: Chromatogram identifikovaných AAL – Planý bez (B08)
Příloha 10: Chromatogram identifikovaných AAL – Allesö (B09)
Příloha 11: Chromatogram identifikovaných AAL – Riese aus Voßloch (B10)
Příloha 12: Chromatogram identifikovaných AAL – Sambu (B11)
Příloha 13: Chromatogram identifikovaných AAL – Sambo (B12)
Příloha 14: Chromatogram identifikovaných AAL – Albida (B13)
Příloha 15: Chromatogram identifikovaných AAL – Bohatka (B14)
Příloha 16: Chromatogram identifikovaných AAL – Sampo (B15)
Příloha 17: Chromatogram identifikovaných AAL – Samyl (B16)
Příloha 18: Chromatogram identifikovaných AAL – Heidegg (B17)
Příloha 19: Chromatogram identifikovaných AAL – Dana (B18)
Příloha 20: HPLC chromatogramy standardního roztoku DHA (koncentrace B – viz 3.2.5.1.) po 15min redukci pomocí TCEP (A), DTT (B) a L-cysteinu (C) při pH 4
Příloha 21: Stanovení účinnosti redukce DHA na AA v extraktu z plodů rakytníku
Příloha 22: Závislost koncentrace kyseliny askorbové zjištěné z kalibrační křivky na relativní teoretické koncentraci spikovaných roztoků extraktu z plodů rakytníku
Příloha 23: HPLC chromatogram extraktu z plodů rakytníku
Příloha 24: Stanovení účinnosti redukce DHA na AA v extraktu z plodů bezu černého (ukázka pro odrůdu B01 – Haschberg)
Příloha 25: Závislost koncentrace kyseliny askorbové zjištěné z kalibrační křivky na relativní teoretické koncentraci spikovaných roztoků extraktu z plodů bezu černého (B01 - Haschberg)
Příloha 26: HPLC chromatogramy extraktu z plodů bezu černého (Haschberg – B01) před (A) a po (B) 15min redukci pomocí TCEP při pH 4
Příloha 27: Naměřené hodnoty ploch píků, kalibrační závislosti a vypočtené koncentrace AA v plodech zkoumaných odrůd bezu černého a rakytníku

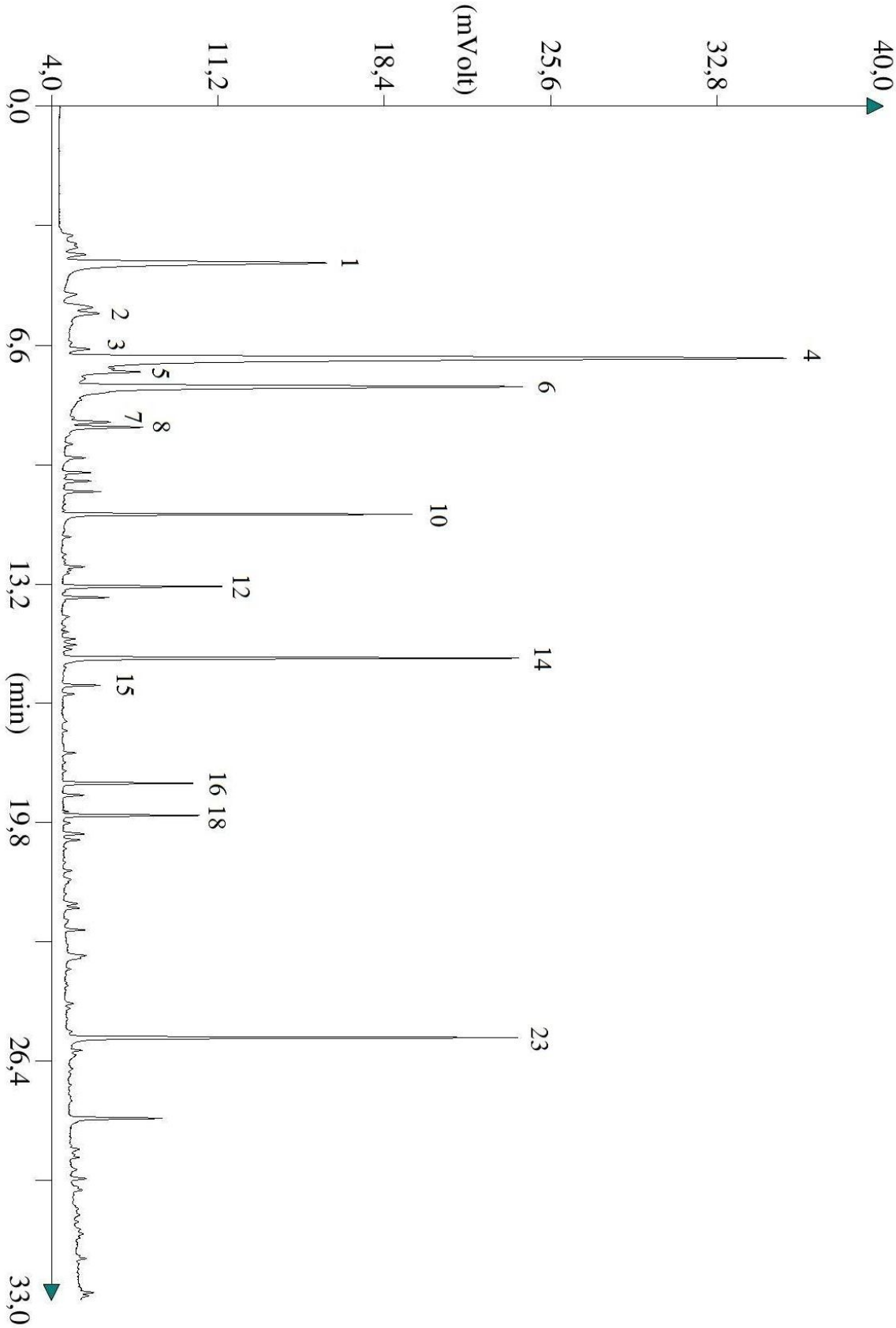
Příloha 1: Legenda k chromatogramům

Číslo píku	Sloučenina
1	ethanal
2	octan methylnatý
3	octan ethylnatý
4	methanol
5	3-methylbutan-1-al
6	ethanol
7	pentanal
8	methylbutanoát
9	ethylbutanoát
10	hexanal
11	pentan-2-ol
12	butan-1-ol
13	2-methylbutan-1-ol
14	E-2-hexenal
15	pentan-1-ol
16	hexan-1-ol
17	E-3-hexenol
18	Z-3-hexen-1-ol
19	1-okten-3-ol
20	kyselina octová
21	nonan-2-ol
22	linalool
23	b-damascenon
24	benzylalkohol

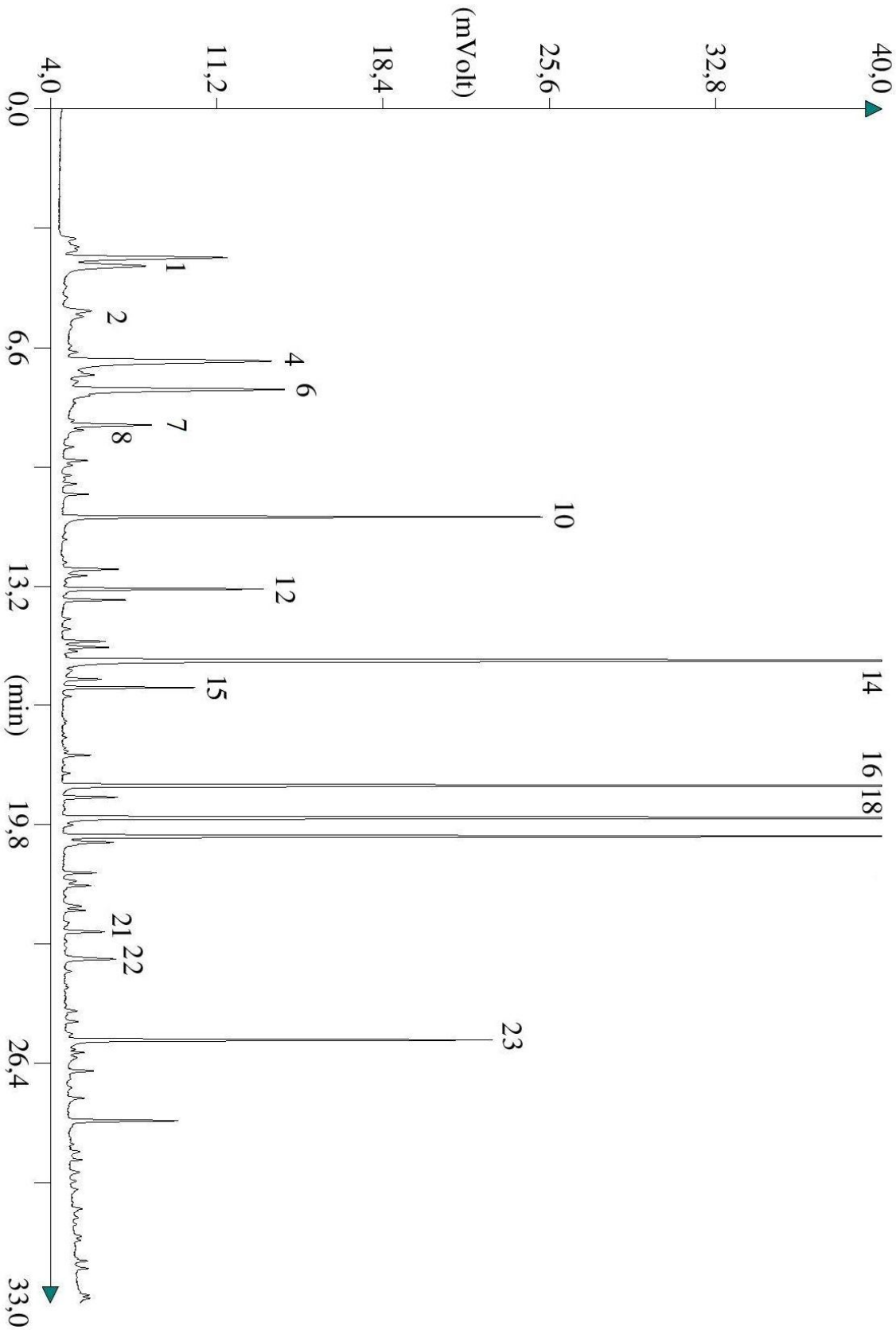
Příloha 2: Chromatogram identifikovaných AAL – Haschberg (B01)



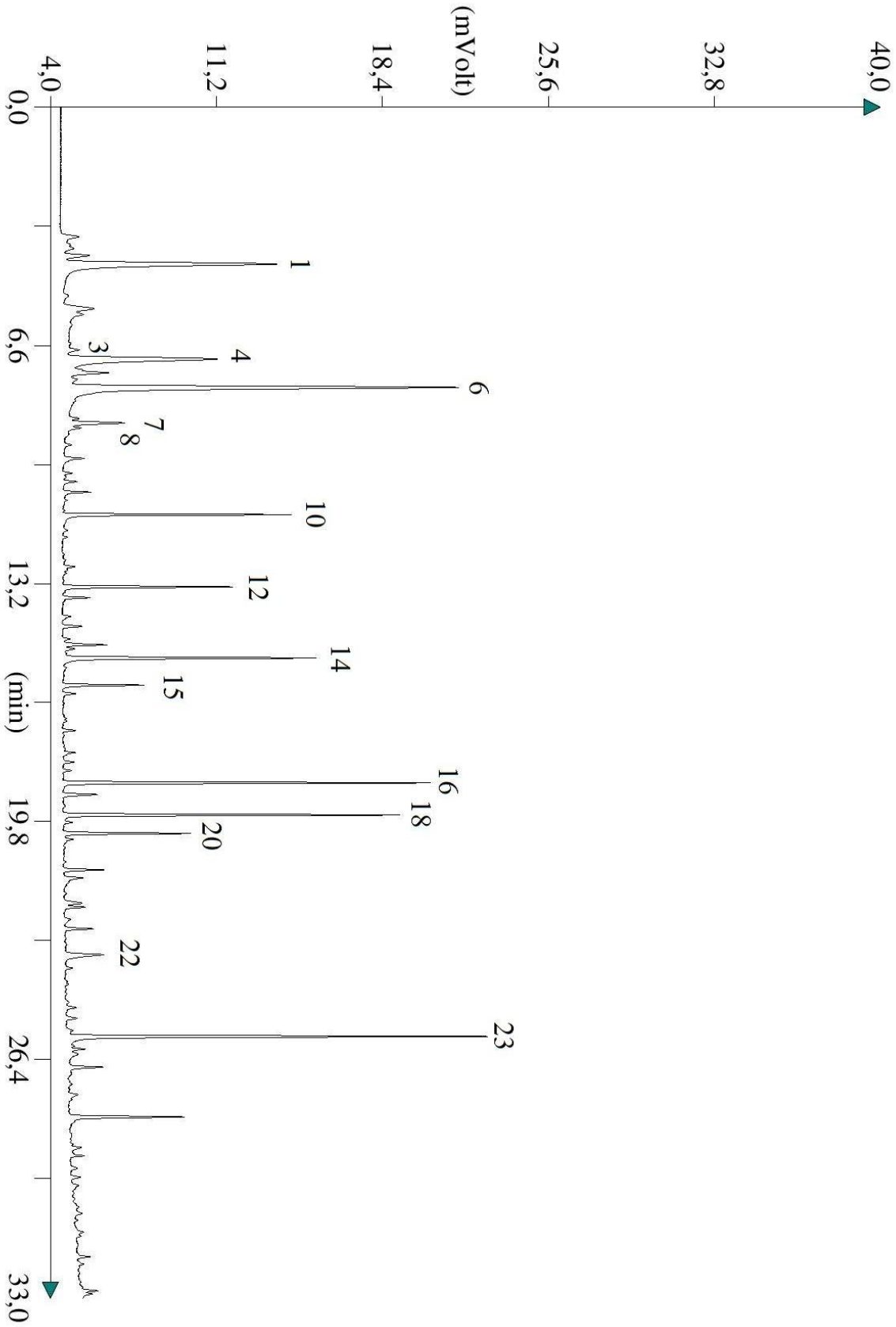
Příloha 3: Chromatogram identifikovaných AAL – Samdal (B02)



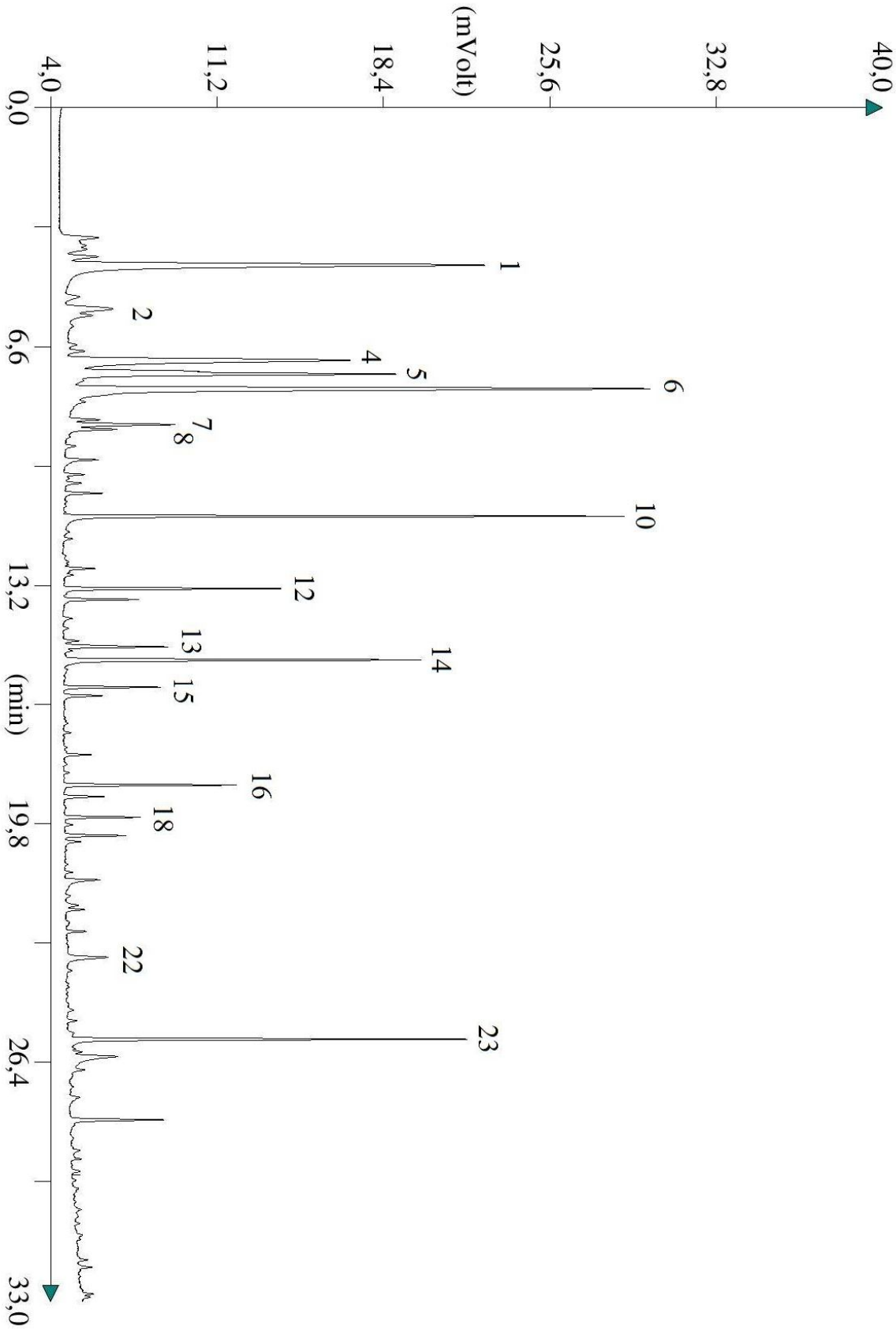
Příloha 4: Chromatogram identifikovaných AAL – Aurea (B03)



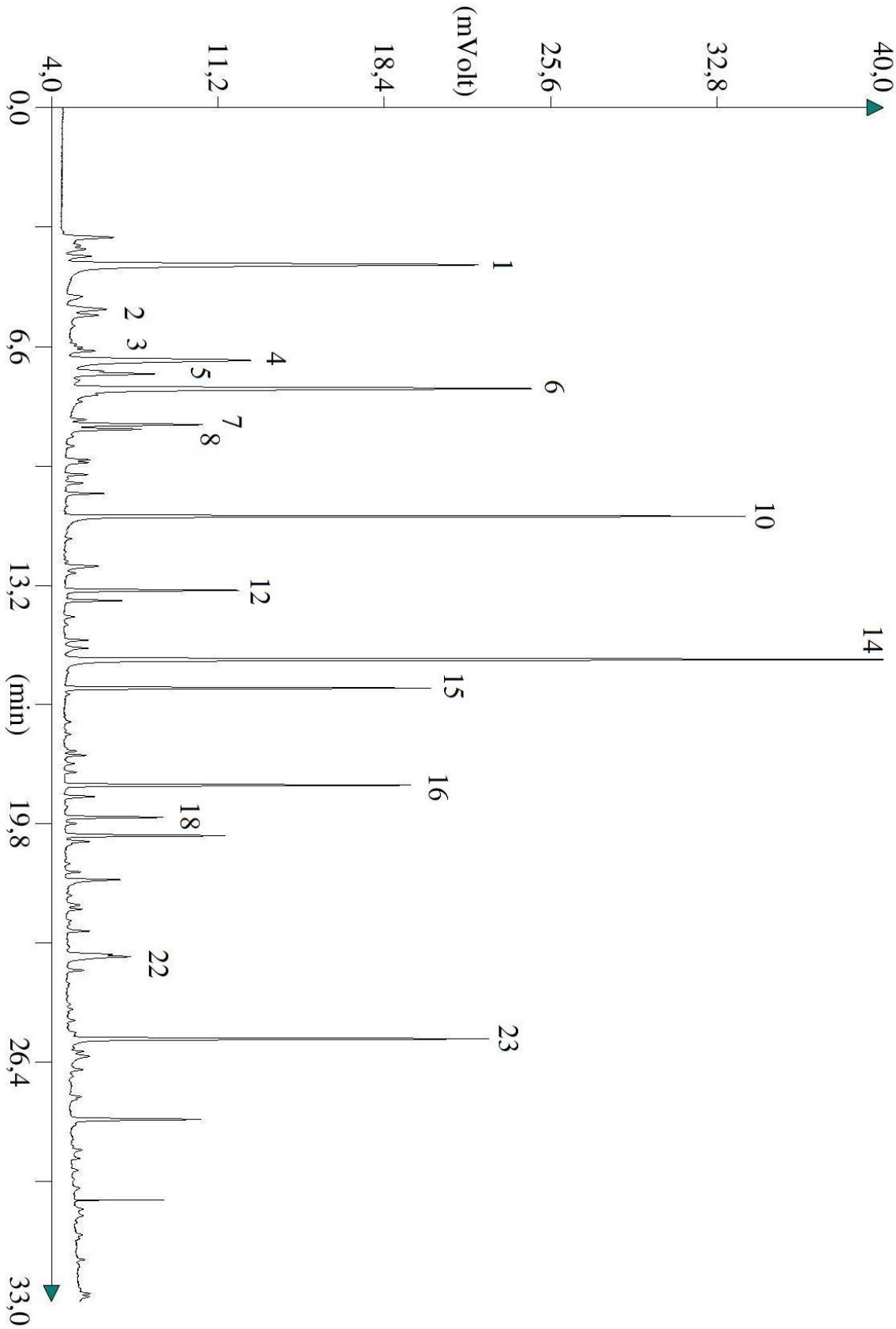
Příloha 5: Chromatogram identifikovaných AAL – Mammut (B04)



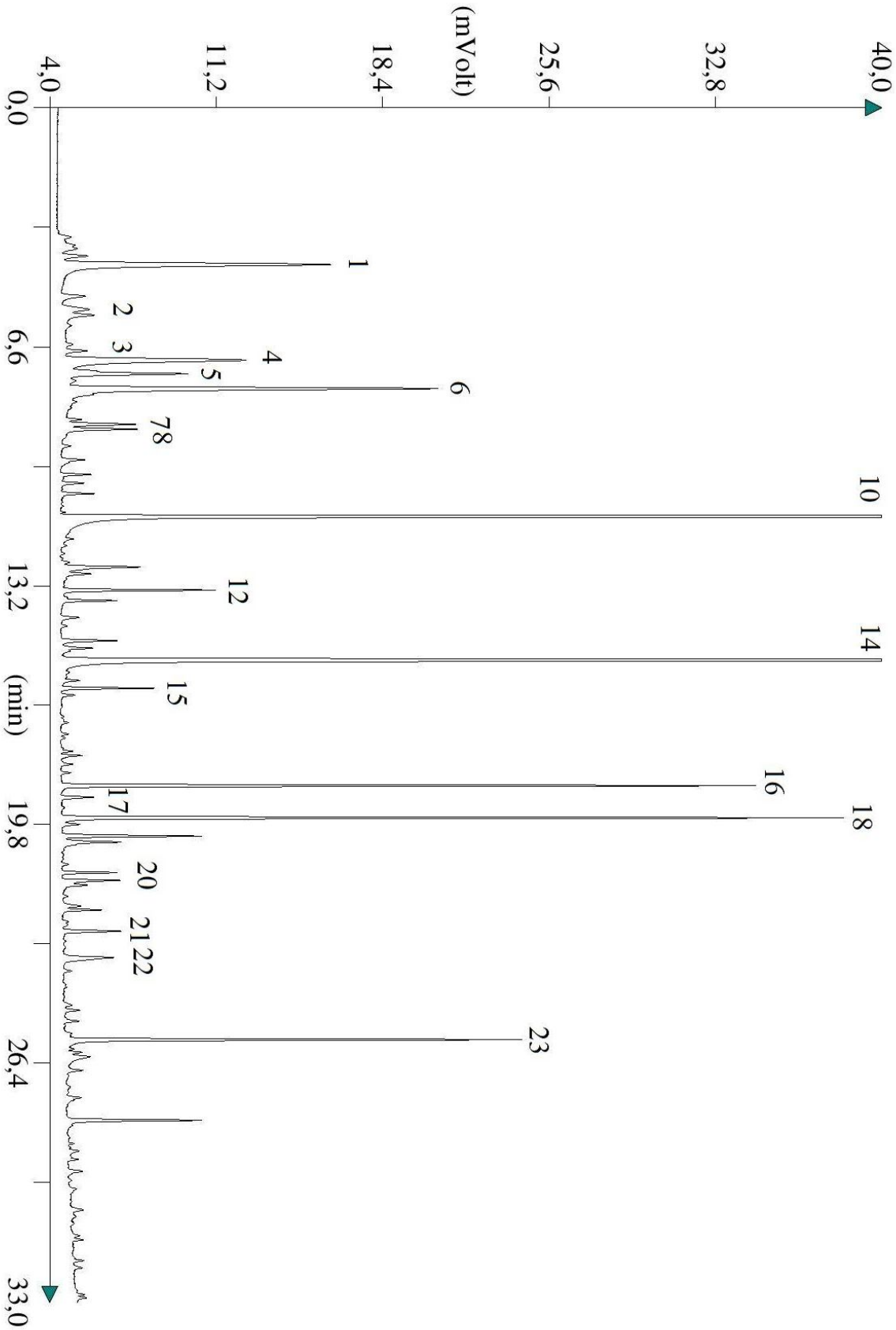
Příloha 6: Chromatogram identifikovaných AAL – Körsör (B05)



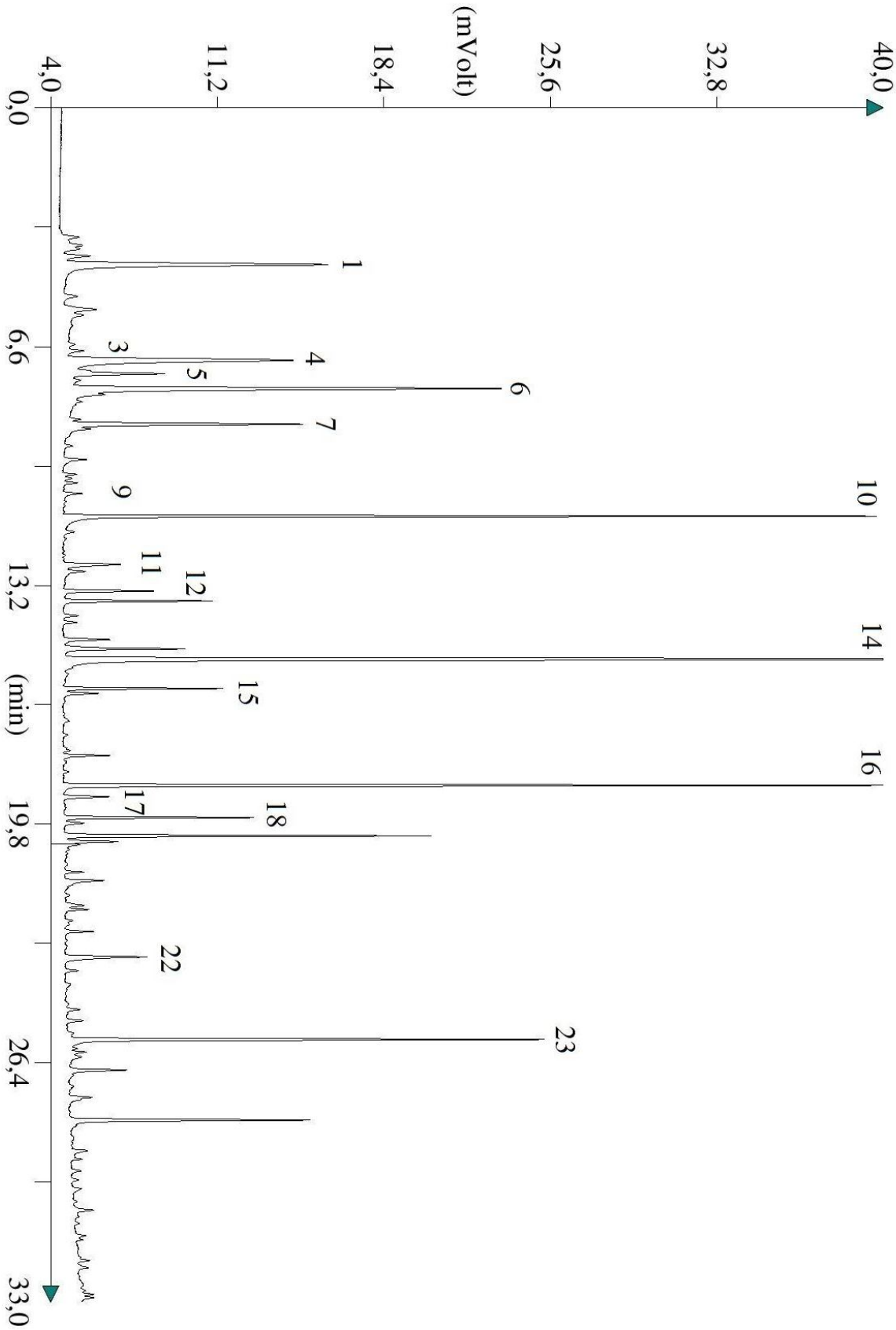
Příloha 7: Chromatogram identifikovaných AAL – Pregarten (B06)



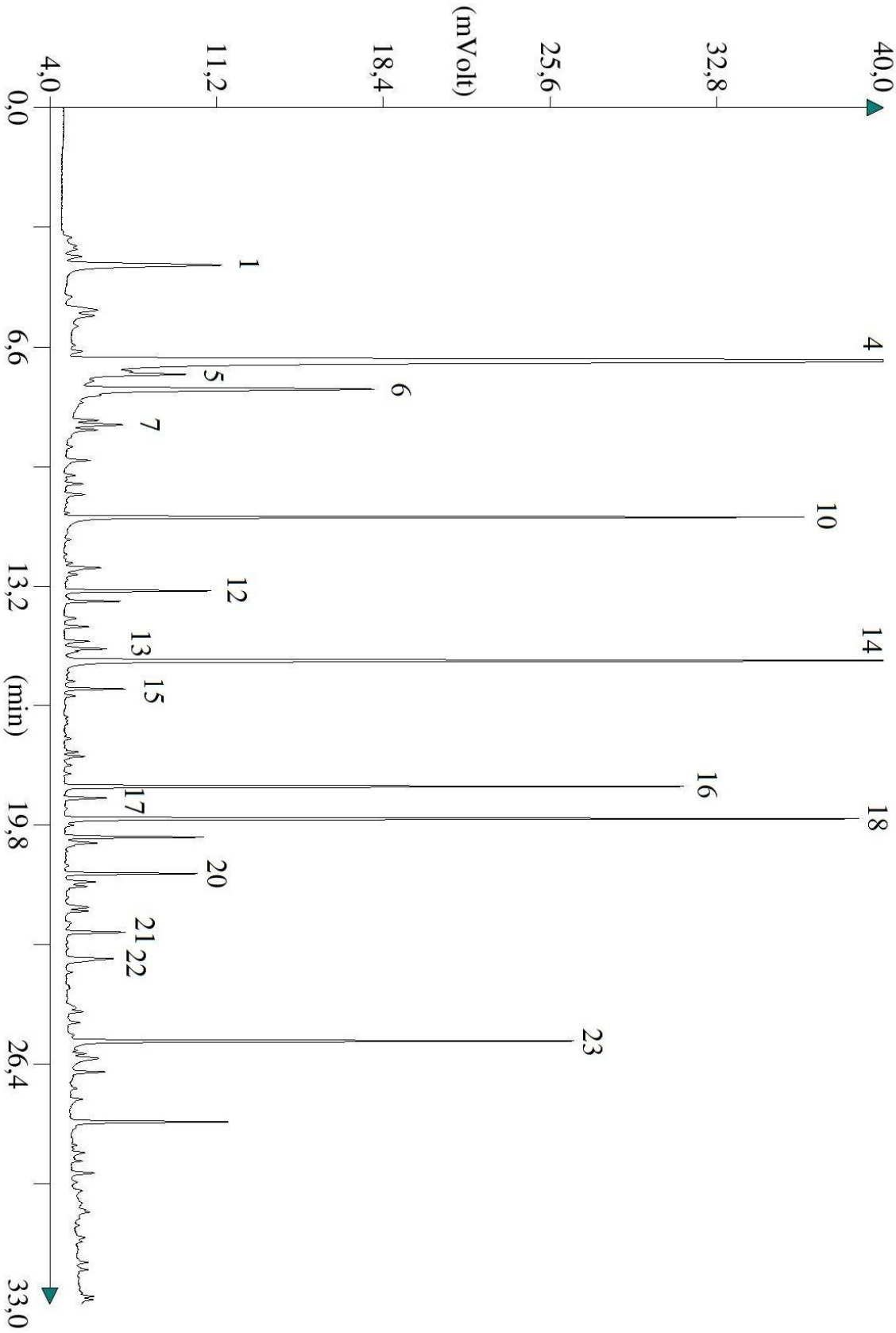
Příloha 8: Chromatogram identifikovaných AAL – Weihenstephan (B07)



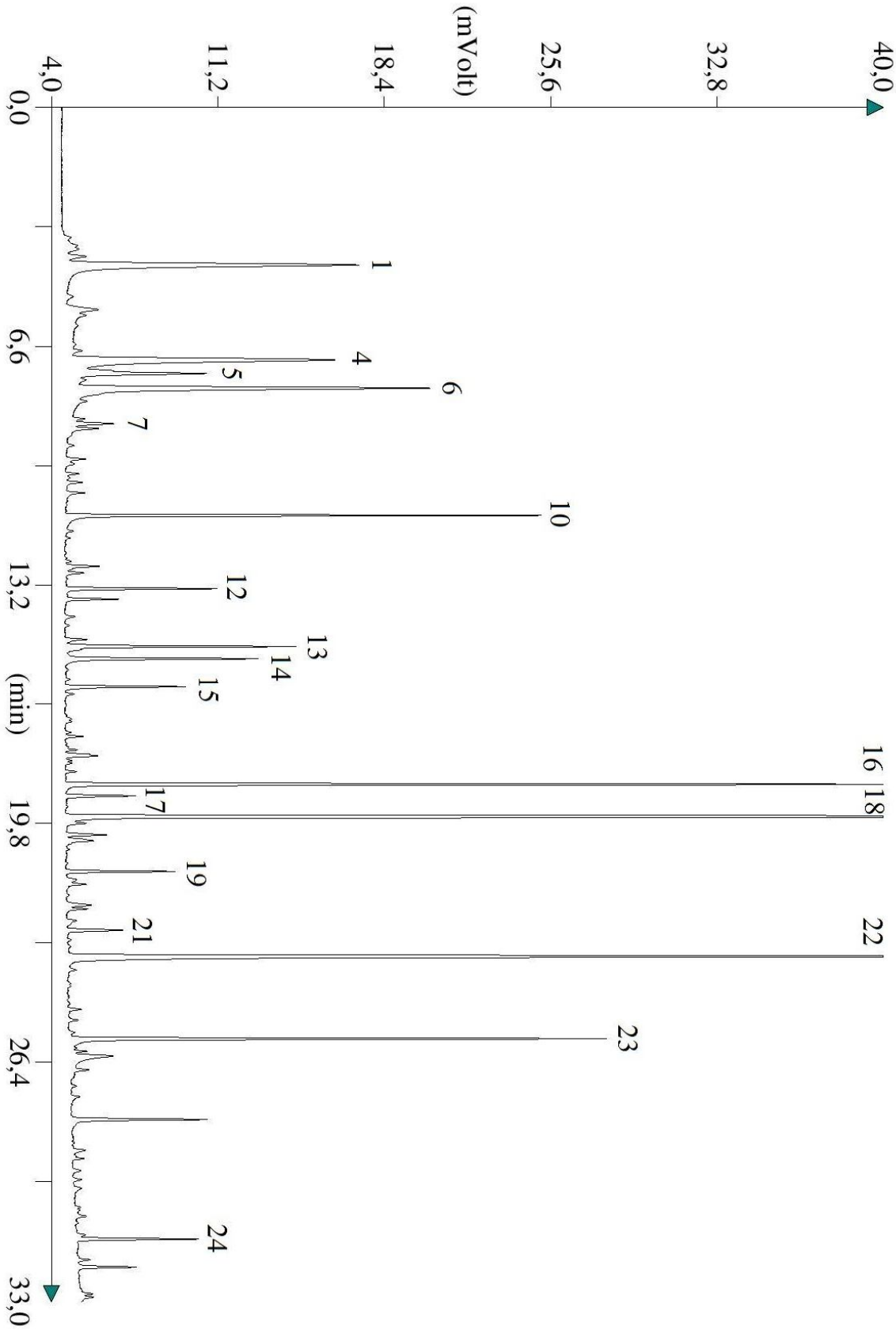
Příloha 9: Chromatogram identifikovaných AAL – Planý bez (B08)



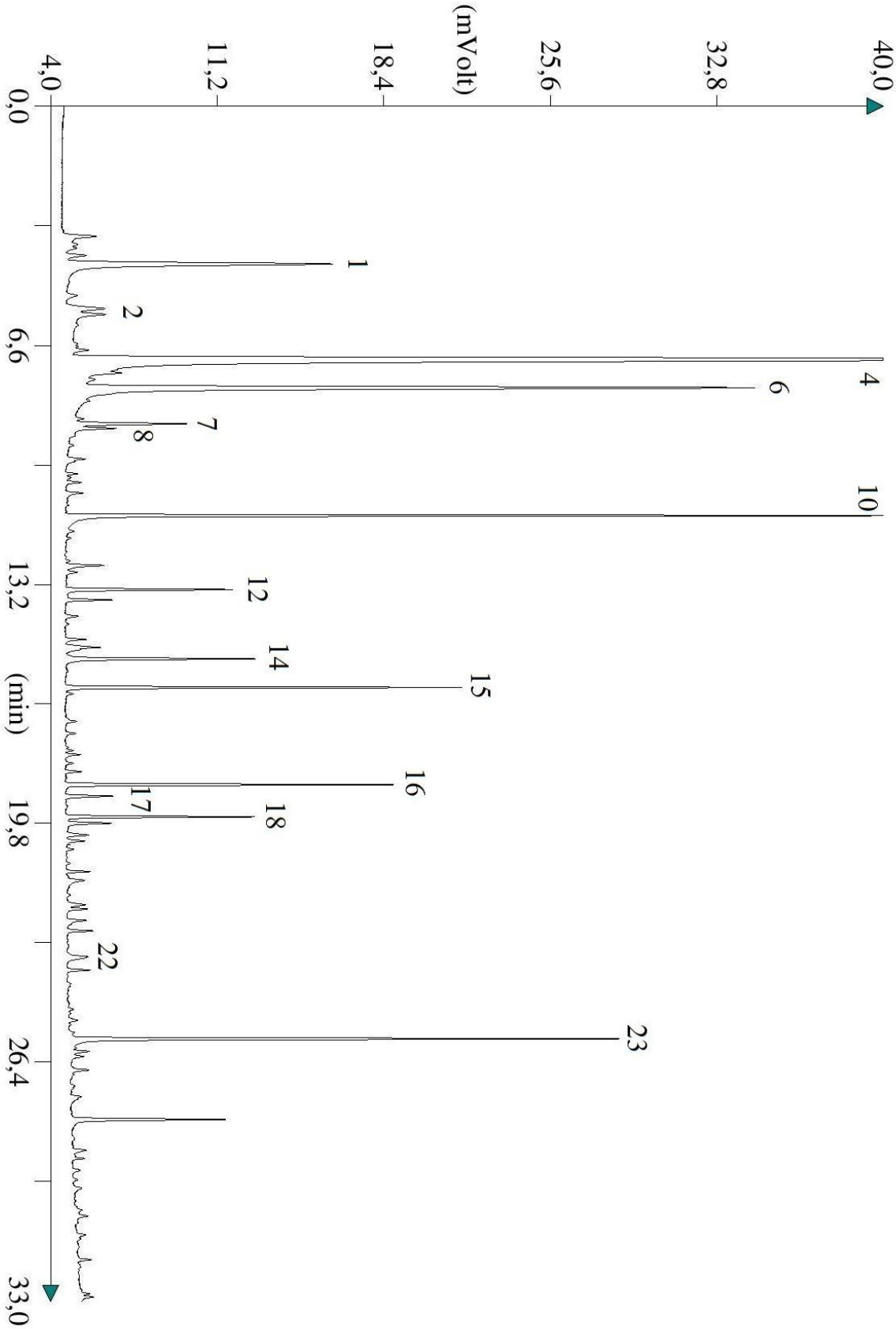
Příloha 10: Chromatogram identifikovaných AAL – Allesö (B09)



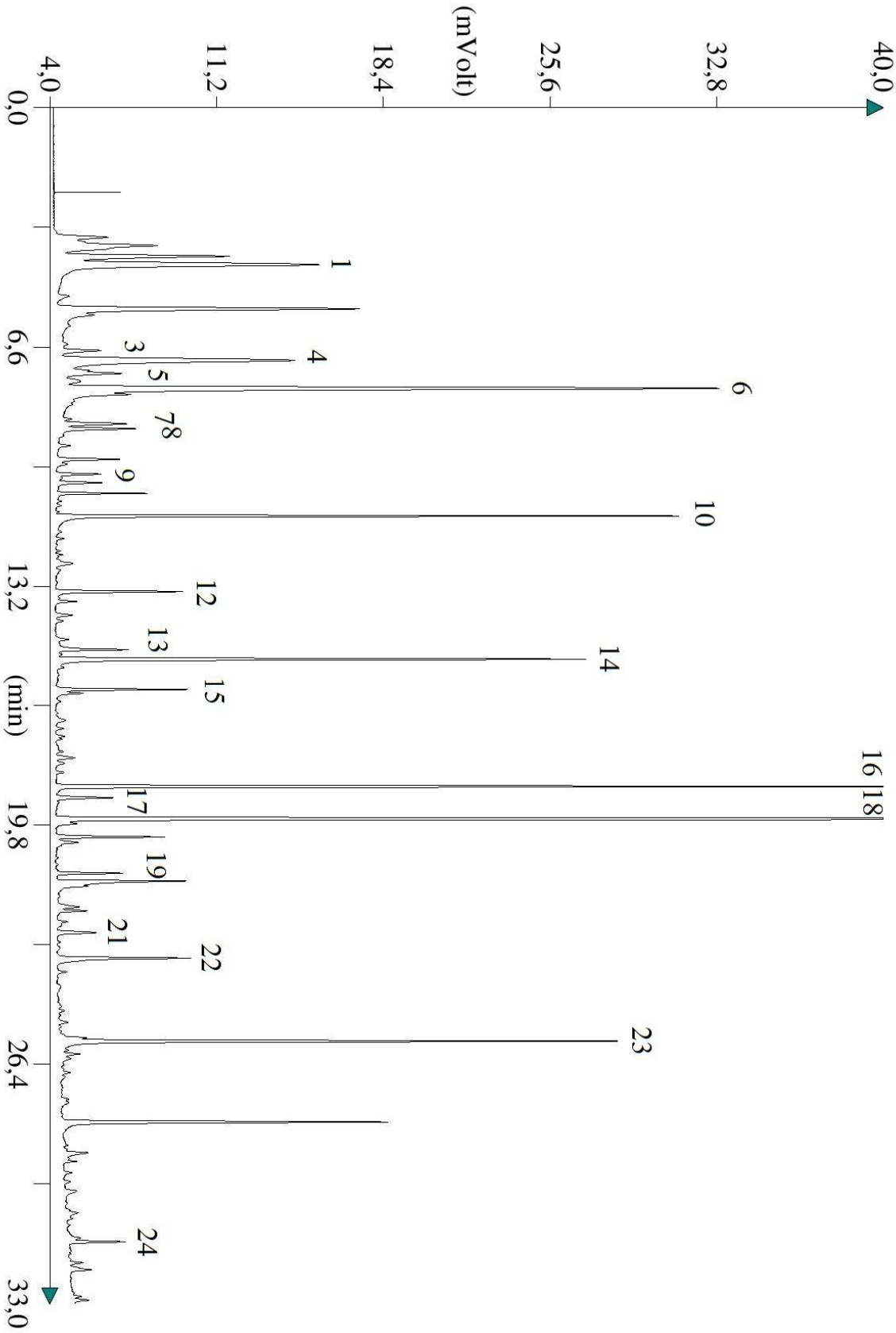
Příloha 11: Chromatogram identifikovaných AAL – Riese aus Voßloch (B10)



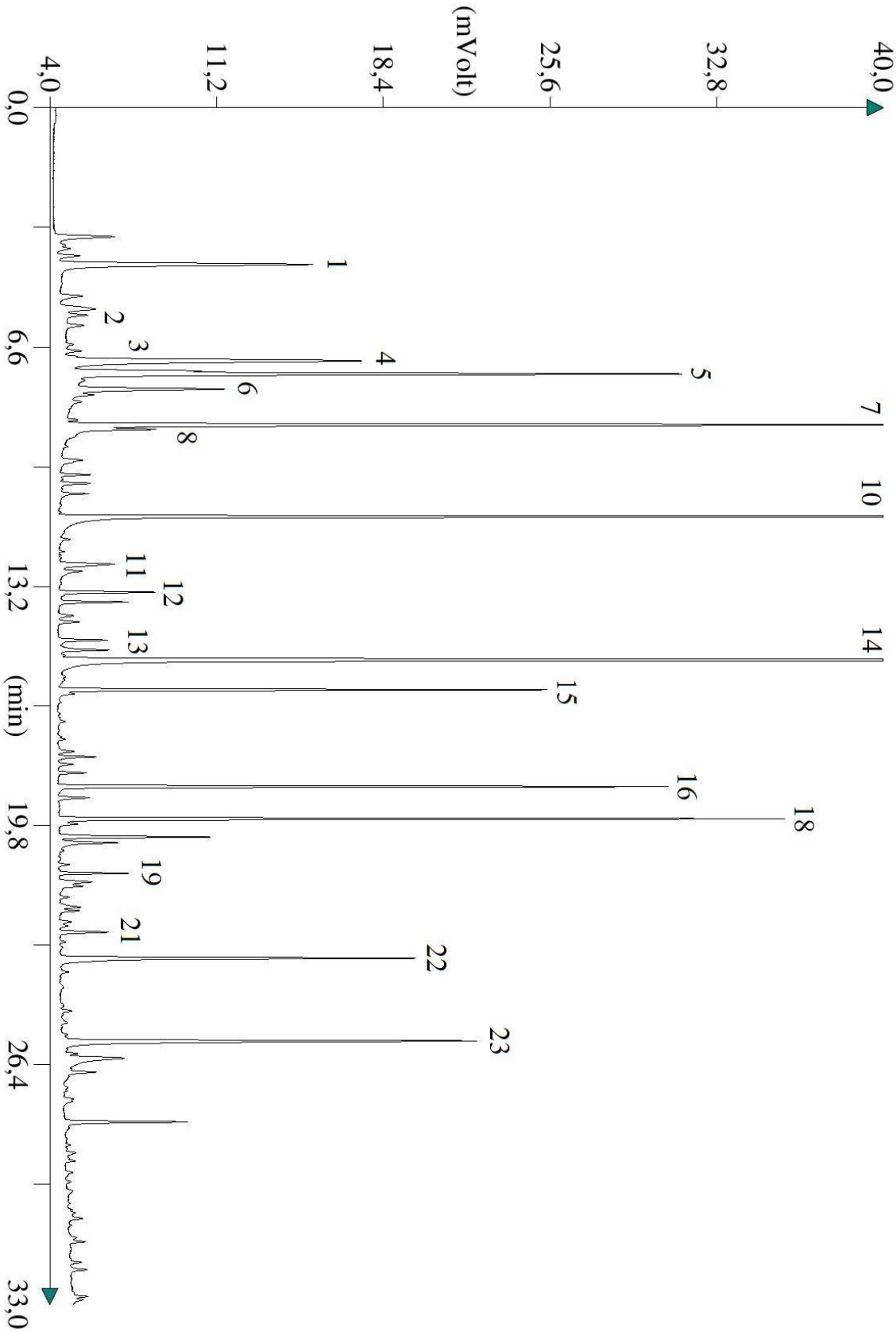
Příloha 12: Chromatogram identifikovaných AAL – Sambu (B11)



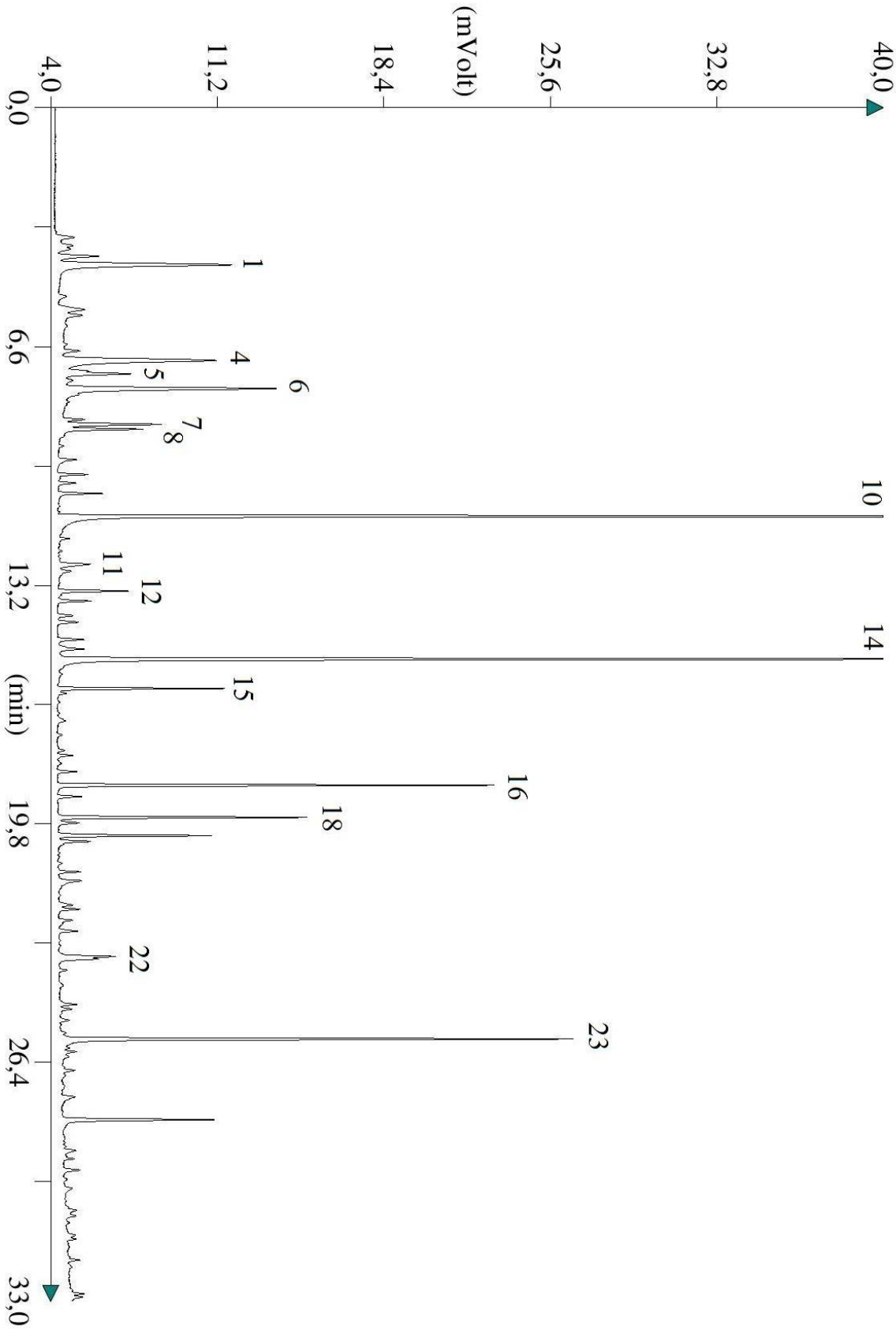
Příloha 13: Chromatogram identifikovaných AAL – Sambo (B12)



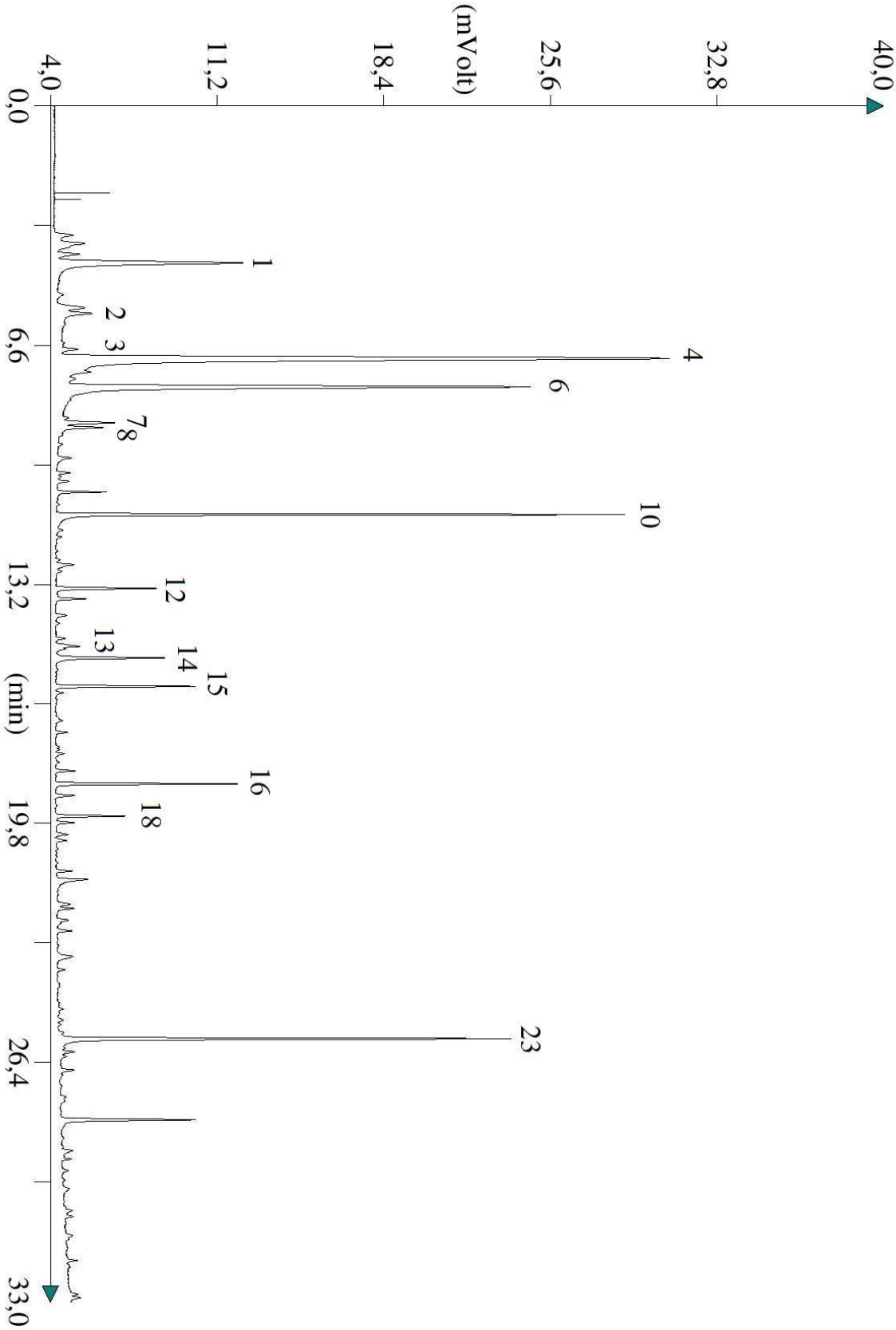
Příloha 14: Chromatogram identifikovaných AAL – Albida (B13)



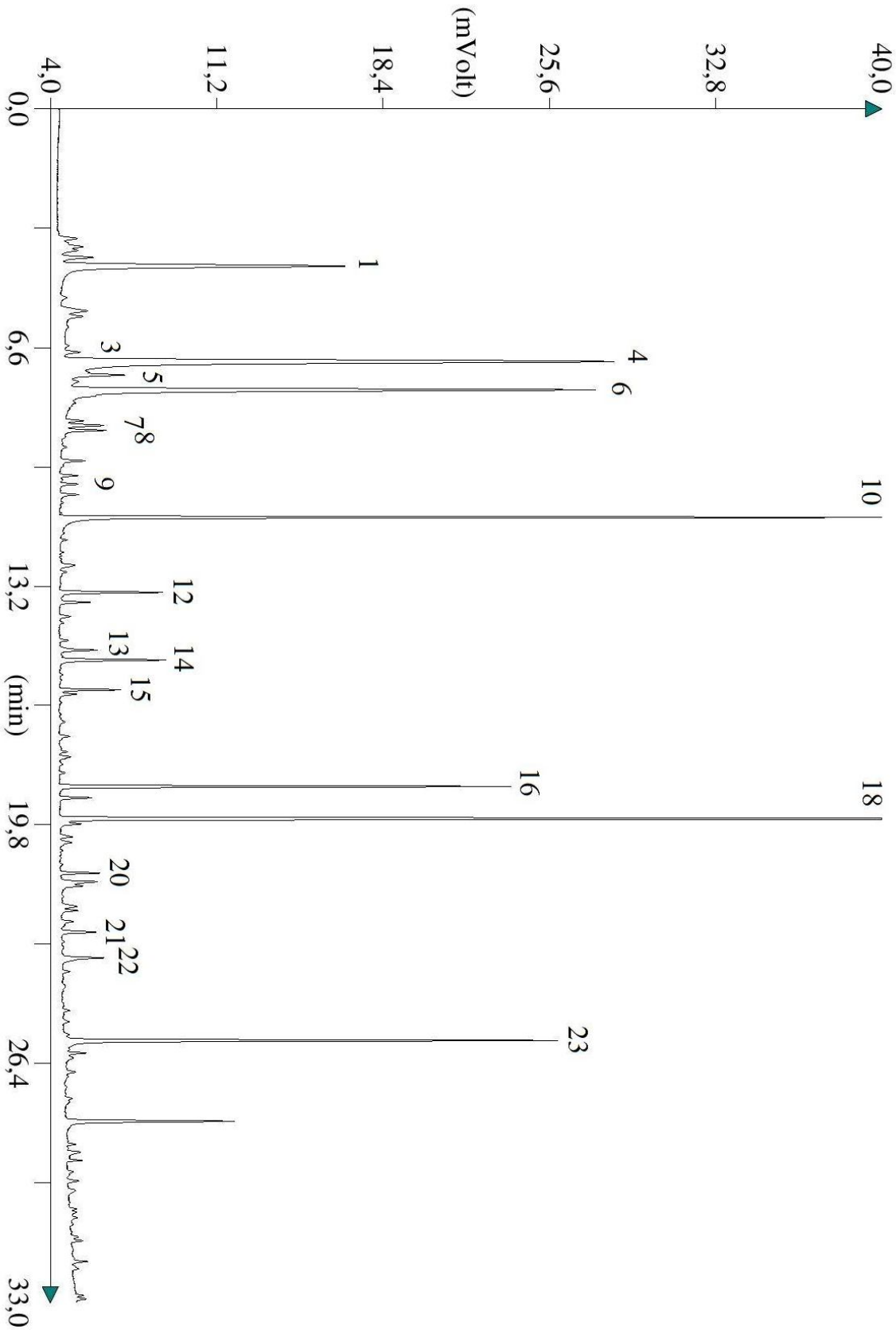
Příloha 15: Chromatogram identifikovaných AAL – Bohatka (B14)



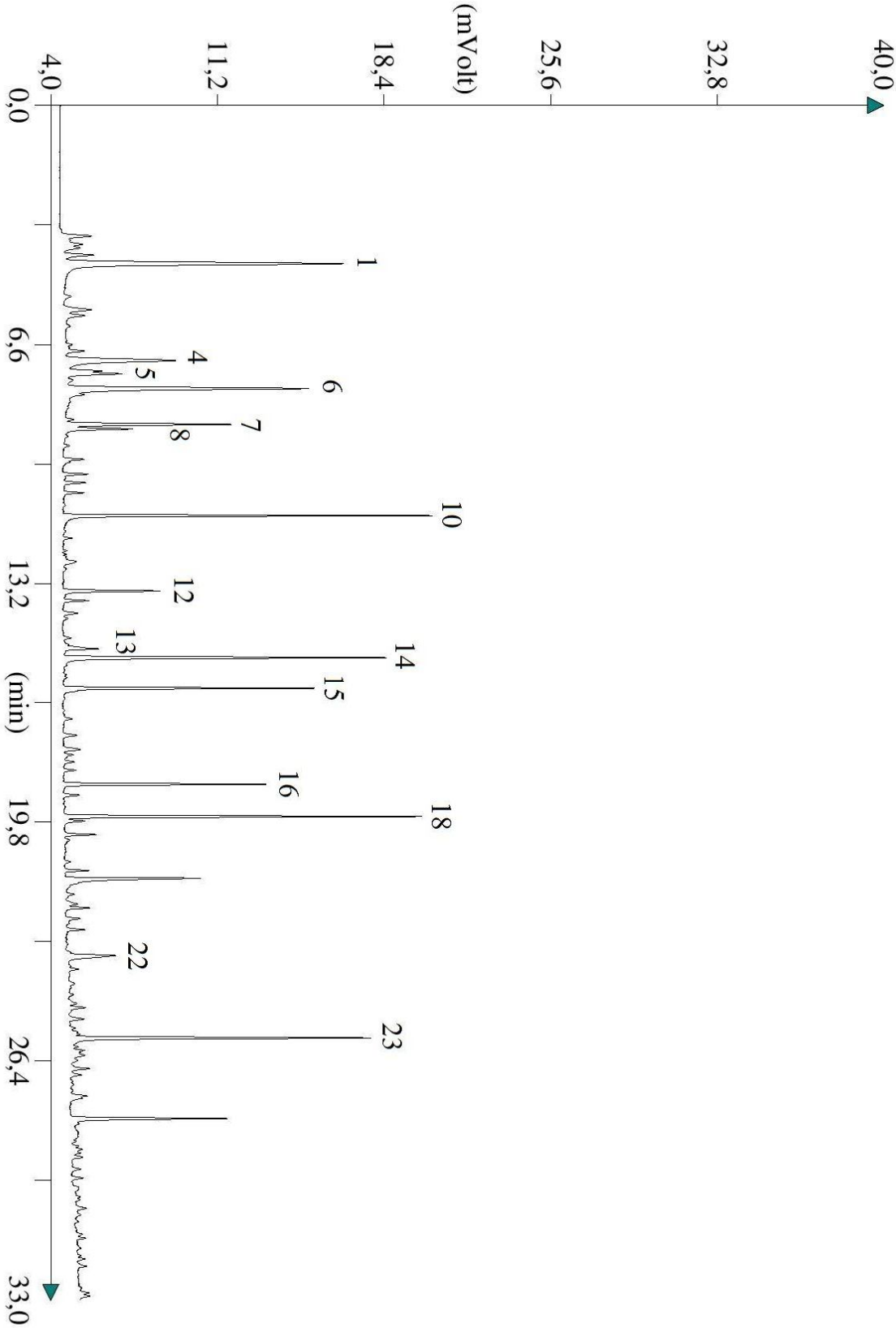
Příloha 16: Chromatogram identifikovaných AAL – Sampo (B15)



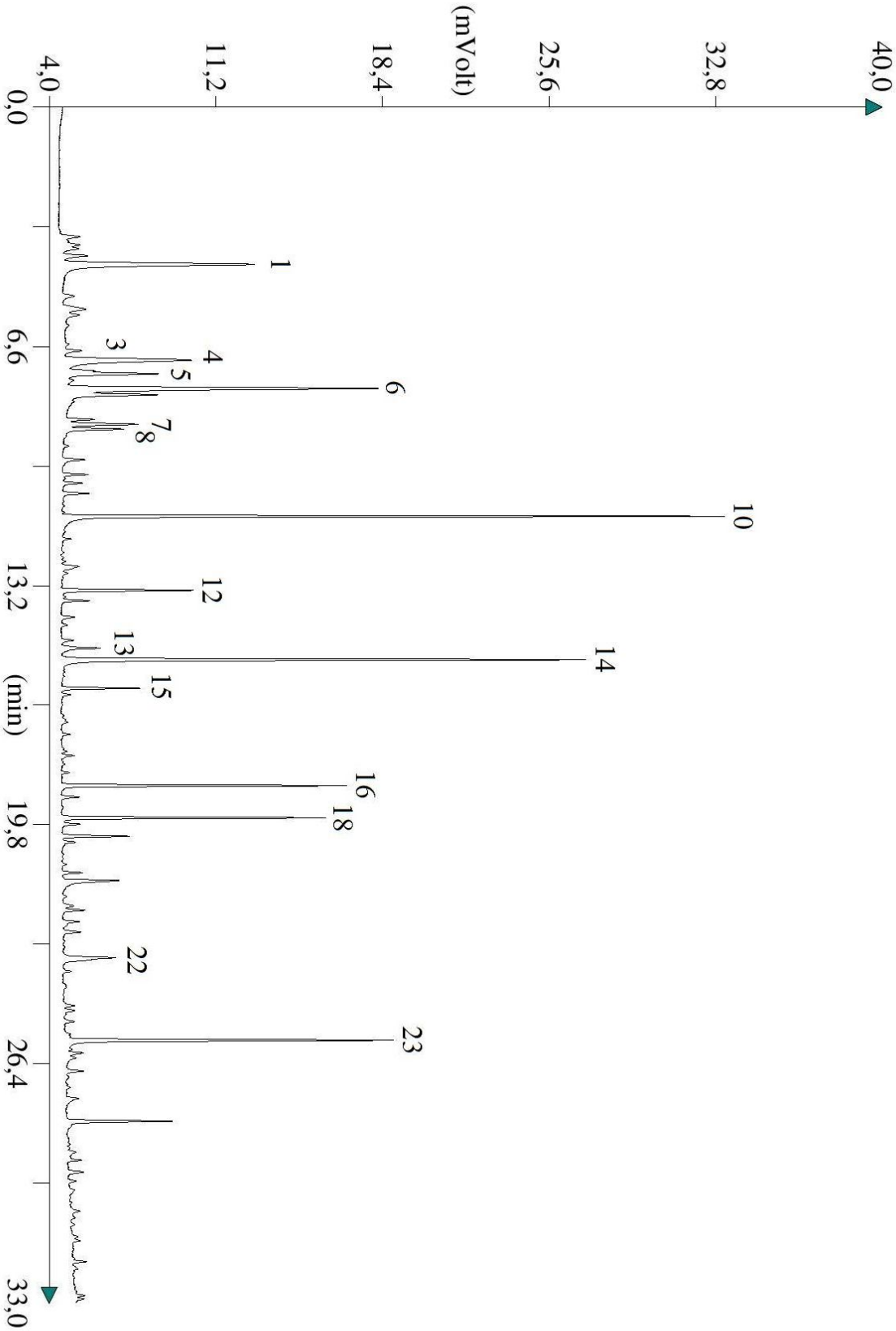
Příloha 17: Chromatogram identifikovaných AAL – Samyl (B16)



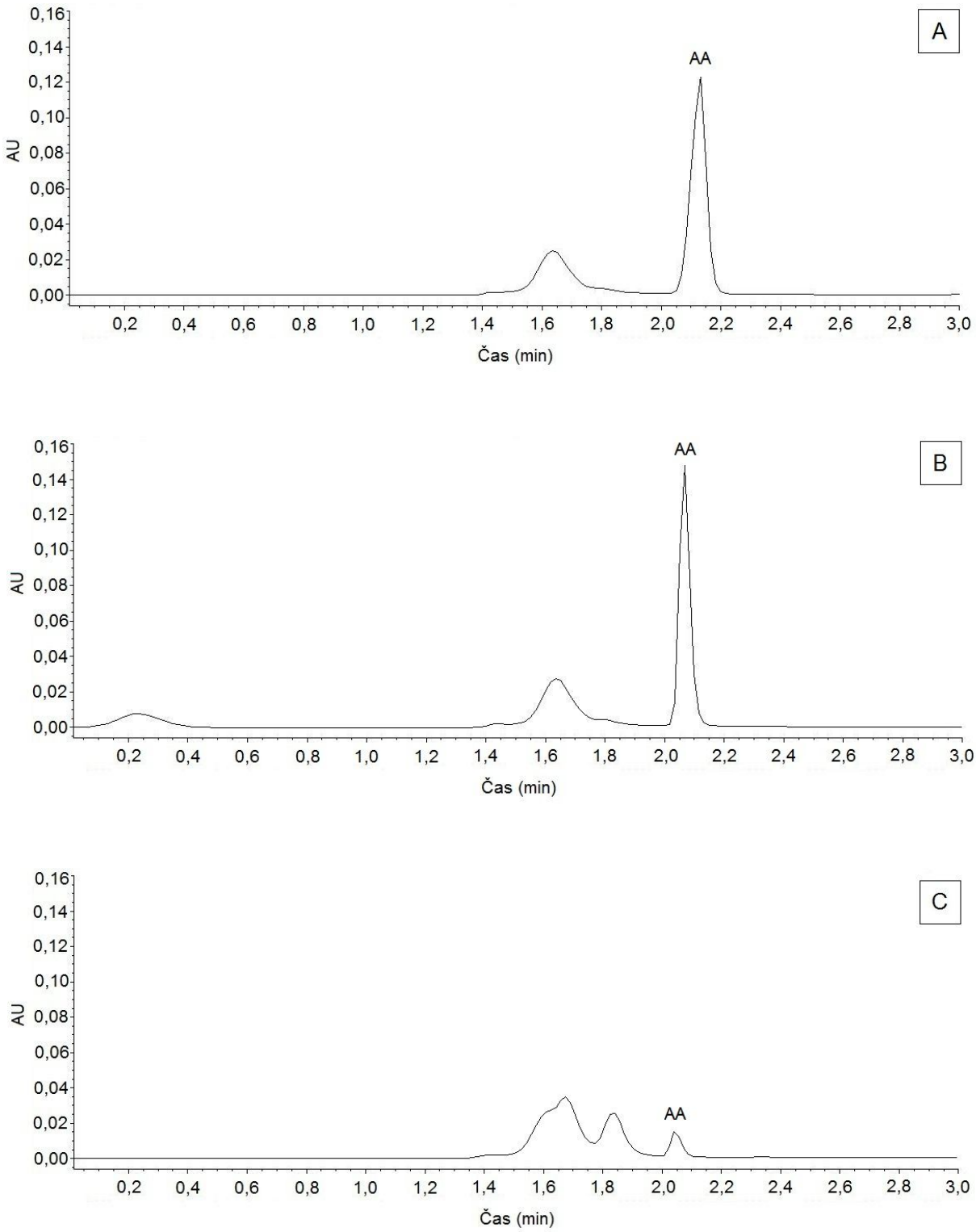
Příloha 18: Chromatogram identifikovaných AAL – Heidegg (B17)



Příloha 19: Chromatogram identifikovaných AAL – Dana (B18)



Příloha 20: HPLC chromatogramy standardního roztoku DHA (koncentrace B - viz 3.2.5.1.) po 15min redukci pomocí TCEP (A), DTT (B) a L-cysteinu (C) při pH 4



Příloha 21: Stanovení účinnosti redukce DHA na AA v extraktu z plodů rakytníku

Přídavek DHA do vzorku	Koncentrace AA z KK ($mg \cdot l^{-1}$)	Skutečná konc. přidané DHA ($mg \cdot l^{-1}$)	Relativní teor. konc. vůči A	Naměřená relat. teor. konc. vůči A	Účinnost redukce (%)
0	41,2*	0	-	-	-
A	53,4	12,2	1	1	-
B	67,5	26,2	2,5	2,2	86
C	97,7	56,5	5	4,6	93

** Koncentrace zjištěna z regresní rovnice (její průsečík s osou y), viz graf 27*

A, B, C - viz tabulka 5 v kapitole 3.2.5

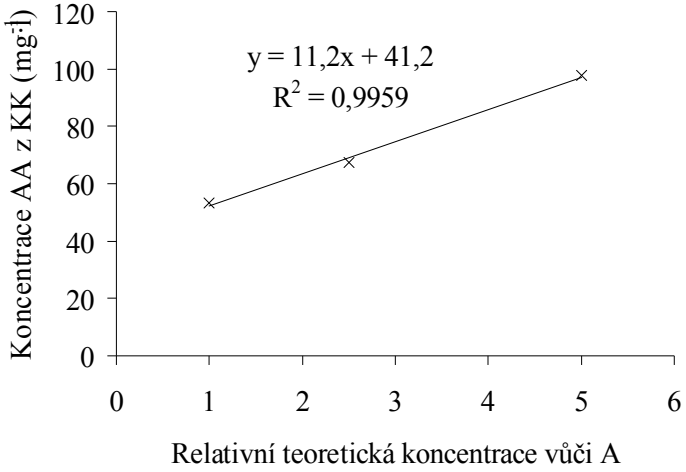
KK – kalibrační křivka: $y = 60692 \cdot x - 5736$, $R^2 = 1$

Skutečná koncentrace přidané DHA – rozdíl koncentrace AA z KK a stanovené koncentrace AA obsažené ve vzorku při nulovém přídavku DHA do vzorku (zjištěné z regresní rovnice)

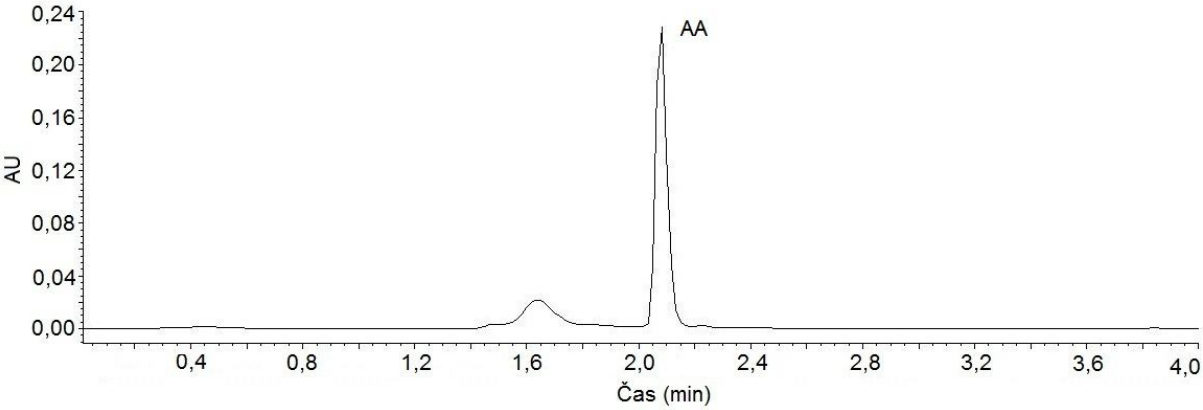
Naměřená teor. konc. vůči A – poměr skutečné koncentrace přidané DHA roztoku B (resp. C) ku skutečné koncentraci přidané DHA roztoku A

Účinnost redukce – podíl naměřené relat. teor. konc. vůči A a relativní teor. konc. vůči A, převedena na procenta

Příloha 22: Závislost koncentrace kyseliny askorbové zjištěné z kalibrační křivky na relativní teoretické koncentraci spikovaných roztoků extraktu z plodů rakytníku



Příloha 23: HPLC chromatogram extraktu z plodů rakytníku

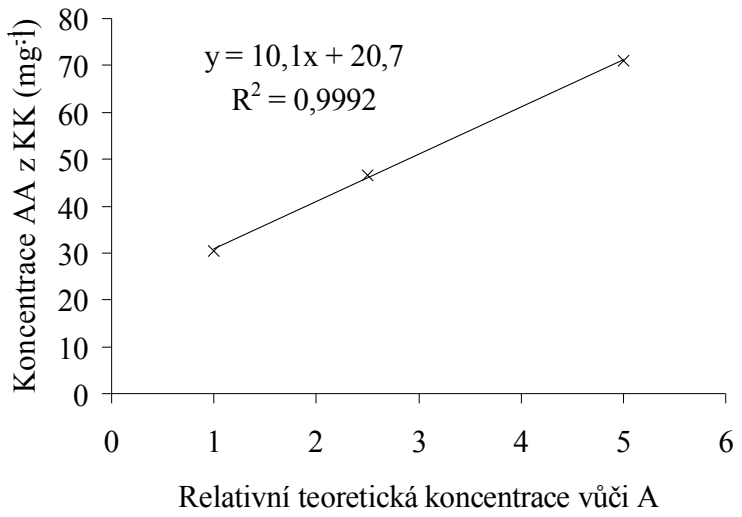


Příloha 24: Stanovení účinnosti redukce DHA na AA v extraktu z plodů bezu černého (ukázka pro odrůdu B01 – Haschberg)

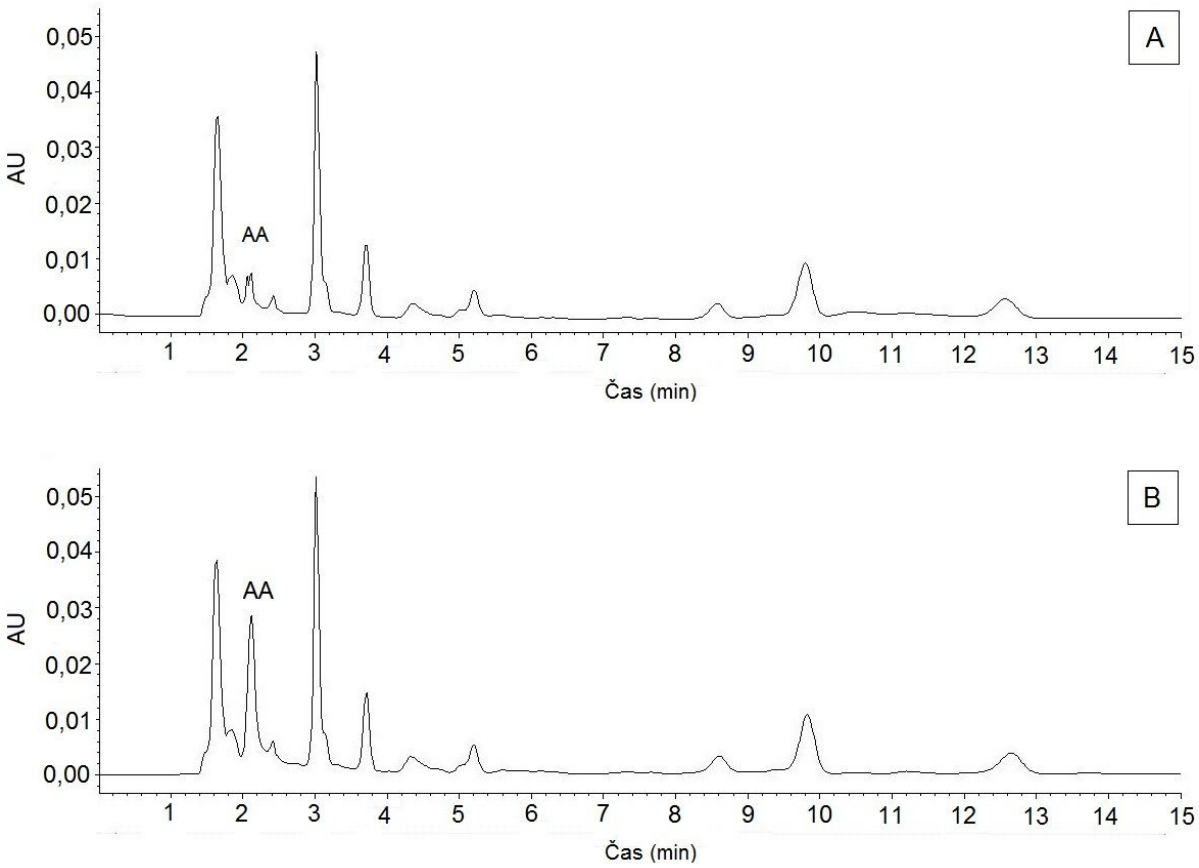
Přídavek DHA do vzorku	Koncentrace AA z KK ($mg \cdot l^{-1}$)	Skutečná konc. přidané DHA ($mg \cdot l^{-1}$)	Relativní teor. konc. vůči A	Naměřená relat. teor. konc. vůči A	Účinnost redukce (%)
0	20,7*	0	-	-	-
A	30,4	9,7	1	1	-
B	46,6	16,3	2,5	1,7	67
C	71,0	24,4	5	2,5	50

Poznámka: Vysvětlivky viz příloha 21; KK: $y = 60251 \cdot x - 17926$

Příloha 25: Závislost koncentrace kyseliny askorbové zjištěné z kalibrační křivky na relativní teoretické koncentraci spikovaných roztoků extraktu z plodů bezu černého (B01 - Haschberg)



Příloha 26: HPLC chromatogramy extraktu z plodů bezu černého (Haschberg – B01) před (A) a po (B) 15min redukci pomocí TCEP při pH 4



Příloha 27: Naměřené hodnoty ploch píků, kalibrační závislosti a vypočtené koncentrace AA v plodech zkoumaných odrůd bezu černého a rakytníku

Označení	Plocha píku AA* (µV·s)			AA před redukcí ($mg \cdot l^{-1}$)			AA po redukci ($mg \cdot l^{-1}$)
	před redukcí		po redukci				
	a	b		a	b	průměr ± sm.odch.	
B01	137569	20774	184985	2,58	2,57	2,58 ± 0,01	13,47
B08	92599	13292	179342	1,83	2,07	1,95 ± 0,12	13,10
B10	165104	42970	168976	3,02	3,63	3,33 ± 0,30	12,34
B12	832341	180717	462558	13,70	13,12	13,41 ± 0,29	31,15
B14	198427	49352	215825	3,36	3,63	3,50 ± 0,13	14,60
R	2536949	634203	618878	41,89	42,18	42,04 ± 0,14	41,17

** průměr hodnot (n=3)*

a – samotný extrakt

b – zředěný extrakt – ředící faktor f = 4

Plocha píku AA po redukci – ředící faktor f = 4

Regresní rovnice viz tabulka 16, kapitola 4.2.1.

Označení – viz tabulka 4, kapitola 3.1.4., R = rakytník, odrůda Leicora