



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

MOŽNOSTI VYUŽITÍ VÝLISKŮ Z PLODŮ ARONIE

THE POSSIBILITY OF USING OF ARONIA FRUIT POMACE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Jana Kujínková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1116/2016
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: Bc. Jana Kujínková
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.
Akademický rok: 2016/17

Název diplomové práce:

Možnosti využití výlisků z plodů aronie

Zadání diplomové práce:

Teoretická část:

- 1) Botanická charakteristika aronie
- 2) Popis kapalinové chromatografie
- 3) Rešerše stanovení anthokyanových barviv metodou HPLC
- 4) Charakteristika anthokyanových barviv

Experimentální část:

- 1) Ověření separačního systému na standardech
- 2) Příprava extraktů z aroniových výlisků
- 3) Analýzy připravených reálných vzorků
- 4) Zpracování získaných dat a interpretace výsledků

Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

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

Bc. Jana Kujínková
student(ka)

RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá možnostmi využití výlisků z plodů aronie. Teoretická část je zaměřena na botanickou charakteristiku aronie, popis HPLC a anthokyanových barviv. V experimentální části se zkoumají různé vlivy extrakčních podmínek na obsah vybraných polyfenolických sloučenin (kyseliny gallová a vanilová, katechin a rutin) ve výliscích aronie. Zmíněné sloučeniny byly v této práci stanovené metodou HPLC. Díky této metodě byl detekován také obsah sacharidů. Množství anthokyanových barviv bylo zjištěno pomocí pH diferenciální metody.

KLÍČOVÁ SLOVA

Aronie, anthokyany, HPLC, výlisky, pH diferenciální metoda, polyfenolické sloučeniny

ABSTRACT

This diploma thesis deals with possibilities of using of aronia fruit pomace. The theoretical part is focused on botanical characteristics of aronia fruit, description of HPLC and anthocyanins dyes. The effects of various extraction conditions on content of some polyphenolic compounds (gallic and vanilla acid, catechin and rutin) in aronia berry pomace are investigated in the experimental part. The mentioned compounds were detected with HPLC. Thanks to this method the content of carbohydrates was also detected. A quantity of anthocyanins dyes was determined by pH differential method.

KEYWORDS

Aronia melanocarpa, anthocyanins, HPLC, pomace of black chokeberry, pH differential method, polyphenolic compounds

KUJÍNKOVÁ, J. *Možnosti využití vylisků z plodů aronie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017, 65 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Velice děkuji vedoucí své diplomové práce, paní RNDr. Mileně Vespalcové, Ph.D., za její rady, vedení, čas věnovaný konzultacím a práci v laboratoři. Dále panu Ing. Jaromíru Pořízkovi, Ph.D. za jeho čas, ochotu, pomoc a realizaci měření. Panu doc. Ing. Pavlu Divišovi, Ph.D. za jeho čas, ochotu a zprostředkování výsledků měření. A paní Ing. Barboře Hohnové, Ph.D. z Ústavu analytické chemie AV ČR za pomoc při realizování PFE.

Nemalé poděkování patří i mým rodičům, sestrám, kamarádům a kamarádkám, kteří mi svým časem, věnovaným hlídání mých dětí, umožnili studium na této škole a napsání této práce. A mým dvěma malým synům, kteří se mnou tento nelehký čas zvládli.

OBSAH

1. ÚVOD	9
2. TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1 Botanická charakteristika aronie	10
2.2 Chemické složení plodů aronie	11
2.2.1 Bílkoviny	11
2.2.2 Sacharidy	11
2.2.3 Minerální látky a vitaminy.....	12
2.2.4 Vlákna.....	12
2.2.5 Lipidy.....	12
2.2.6 Organické kyseliny	13
2.2.7 Polyfenolické sloučeniny.....	13
2.3.1.1 Fenolické kyseliny.....	13
2.3.1.2 Flavonoidy.....	14
2.3.1.3 Anthokyanová barviva	15
2.3.1.4 Flavonoly.....	17
2.3.1.5 Flavanoly a proanthokyanidiny	18
2.3 Zdravotní účinky aronie	19
2.4 Využití aronie.....	20
2.5 Extrakce anthokyanů.....	20
2.6 HPLC	22
2.6.1 Teoretická východiska chromatografie.....	22
2.6.2 Separční systémy v HPLC	22
2.6.2.1 Separace na normálních fázích (NP-LC).....	22
2.6.2.2 Systém s obrácenými fázemi (RP-LC).....	23
2.6.3 Součásti kapalinového chromatografu.....	23
2.6.3.1 Čerpadlo	23
2.6.3.2 Odplynění	24
2.6.3.3 Dávkovací zařízení	24
2.6.3.4 Kolona	24
2.6.3.5 Detektor	25
2.6.3.6 Počítač	26
2.7 Stanovení anthokyanových barviv metodou HPLC.....	26
2.8 Stanovení anthokyanů pH diferenciální metodou	30

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
3.1 Laboratorní vybavení	31
3.1.1 Chemikálie	31
3.1.2 Pomůcky	31
3.1.3 Přístroje	31
3.2 Příprava vzorků	32
3.2.1 Extrakce	32
3.3 Měření	33
3.3.1 Analýza polyfenolových sloučenin	33
3.3.2 Analýza sacharidů	34
3.3.3 Stanovení anthokyanových barviv pH diferenciální metodou	35
3.3.3.1 Příprava pufrů	35
3.3.3.2 Příprava vzorků	35
3.3.3.3 Výpočet	36
4. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	37
4.1 Stanovení anthokyanů pH diferenciální metodou	37
4.2 Stanovení polyfenolických sloučenin metodou HPLC	42
4.3 Stanovení sacharidů metodou HPLC	52
5. ZÁVĚR.....	56
6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	58
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	62
8. SEZNAM POUŽITÝCH PŘÍLOH.....	63
9. PŘÍLOHY	64

1. ÚVOD

Aronii a jejím méně známým plodům se v poslední době začíná věnovat čím dál větší pozornost. Ze svého okolí vnímám, jak se lidé zajímají o zdravý životní styl a snaží se tomu přizpůsobit především svůj jídelníček. Na „moderní“ pojem antioxidant slyší rádo spousta lidí. Aronii se přezdívá královna antioxidantů.

Šťáva z aronie má velké využití, v tzv. „zdravých výživách“ se prodává především jako čistý pasterovaný mošt nebo nápoje a nektary kombinované s jinými druhy ovoce. Po vylisování šťávy zůstanou aroniové výlisky, které se nejčastěji kompostují. Tyto odpady by však mohly být dále využity, např. pro získání anthokyanových barviv, které jsou cenným potravinářským barvivem přírodního původu. Výlisnost aroniové šťávy je nejvýše 75 %. Zůstává tedy 25 % hmoty aroniových plodů, která by mohla poskytnout nezanedbatelné množství potravinářského barviva.

Vzhledem k nemalému množství polyfenolických sloučenin by se výlisky dále daly využít v podobě kapslí jako doplněk stravy, usušené jako čaje, k dochucování jogurtů nebo při výrobě chleba, z čehož by z něho udělaly funkční potravinu. Mohly by se také ve formě prášku přidávat do různých typů potravin ke zvýšení jejich biologické hodnoty. [1] Sójka a kol. ve své studii upozorňují na velký obsah vlákniny ve výliscích [2].

Tato diplomová práce se proto zabývá možností, jak získat jednoduše a levně zbytkový obsah anthokyanových barviv z aroniových výlisků.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Botanická charakteristika aronie



Obr. 1: *Aronia melanocarpa* [3]

Rod *Aronia* z čeledi růžovitých (*Rosaceae*) zahrnuje tři podobné druhy keřů pocházejících z východní části Severní Ameriky a východu Kanady. Do Evropy se tento keř dostal na přelomu 19. a 20. století nejprve do Německa a poté došlo k jeho rozšíření až do Ruska.

Jedná se o tyto druhy: *Aronia melanocarpa* (temnoplodec černoplodý), známý pod lidovým názvem černý jeřáb nebo černá jeřabina; *Aronia arbutifolia* (temnoplodec planikolistý) a *Aronia prunifolia* (temnoplodec třešňolistý). Posledně jmenovaný je považován za křížence prvních dvou. Druhy aronie se odlišují nejenom barvou plodů, které na nich rostou, ale i jejich velikostí, dále dobou sklizně a také olistěním keře. Malvice druhu *Aronia melanocarpa* mají tmavě modrou až černou barvu a jsou největší, *Aronia arbutifolia* má červené plody a *Aronia prunifolia* fialové. Plody mají v průměru 6 mm i více.

Podle lidových tradic anglický název plodů této rostliny „chokeberry“ vychází ze slovesa „choke“, což v angličtině znamená „dávít se“. Je to z důvodu mimořádně kyselé, navinulé, trpké až svíravé chuti, díky čemuž jsou syrové, nezpracované plody aronie téměř nepoživatelné. Tato chuť je způsobena vysokým obsahem tříslovin. [4]

Aronie roste jako křovina 2-3 m vysoká, široká asi 1,5 m s obdélníkovými, tmavě zelenými voskovými listy, které připomínají listy višně. Na jaře je tento keř ozdoben malými bílými květy, proto se často používá jako okrasná dřevina. Druhým a důležitějším důvodem pěstování aronie je její komerční využití.

Pro komerční pěstitele je zejména lákavé, že tato rostlina není náročná na půdu, údržbu a není ani náchylná k chorobám či k napadání škůdci. Jedná se o velmi odolnou rostlinu, která má ale velké nároky na světlo. Plody jsou též rezistentní vůči hnilobě a ostatním nemocem. I když spadnou na zem, velmi dlouho zůstanou zdravé. K jejich sklizni dochází na konci letních prázdnin- na přelomu srpna a září. Produkce jednoho keře je až 10 kg ovoce a za optimálních podmínek při skladování vydrží až 2 měsíce, aniž by došlo ke snížení jejich kvality.

Mezi nejznámější odrůdy patří 'Nero', pěstovaná v Čechách, 'Moskva', která byla vyšlechtěna v Rusku, švédský 'Hugin', finský 'Viking', dánský 'Aron' a 'Rubina' (od Ruska po Finsko). [5] Dále existuje celá řada kříženců. [6] Nejpopulárnější a nejvýnosnější je odrůda 'Nero', její plody jsou velice bohaté na šťávu. Rozdíly mezi jednotlivými odrůdami jsou velmi malé až nepatrné. [7]

2.2 Chemické složení plodů aronie

Aronie je známa svým velkým obsahem biologicky aktivních složek a vysokou antioxidační kapacitou. [8] Kvantita jednotlivých složek je závislá na mnoha faktorech- na odrůdě, míře zralosti plodů, na době sklizně a místě výskytu. [5] Djuric a kol. zjistili, že kvalita plodů aronie, vypěstovaných v půdě s lehčí aciditou, byla vyšší než na jiných místech. [9] Wangensteen a kol. se zabývali studiem tří kultivarů druhu *Aronia melanocarpa* a jednoho kultivaru druhu *Aronia prunifolia* a zjistili, že kultivar druhu *A. prunifolia* měl nejvyšší obsah polyfenolů, zejména anthokyanů a proanthokyanidinů. [7] Při dřívější sklizni bylo ve šťávě aronie více chlorogenové kyseliny a méně cukru, než ve šťávě z plodů později sklizených. [10]

2.2.1 Bílkoviny

V plodech tohoto ovoce jsou obsaženy bílkoviny v množství 0,7 g na 100 g čerstvých plodů, přičemž hlavní zastoupenou aminokyselinou je asparagin. Bílkoviny rostlin jsou však neplnohodnotné, jelikož se v nich nevyskytují ve vhodném poměru a ani esenciální aminokyseliny nejsou dostatečně zastoupeny. [5, 11] Pieszka a kol. stanovili celkový obsah esenciálních aminokyselin ve vyliscích aronie na 2,89 g na 100 g sušiny. [12]

2.2.2 Sacharidy

Další složkou aroniových plodů jsou sacharidy. Ty vznikají v rostlinných pletivech jako produkty nebo deriváty produktů asimilace. V malvicích aronie převažuje glukóza, jejíž obsah v čerstvě vymačkané šťávě je v průměru 41 g·l⁻¹ a fruktóza: 38 g·l⁻¹. Obsah redukujících cukrů v čerstvých plodech se pohybuje v rozmezí 16-18 %. Oszmiański a Lachowicz ve své studii stanovili množství glukózy 5,08 g·100 g⁻¹ v usušených a zároveň pomletých plodech

a $12,44 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ v pouze usušených plodech. [13] Plody aronie obsahují nezanedbatelné množství sorbitolu (alkoholického cukru). Nicméně se nejedná o sloučeninu, která by se běžně nacházela v plodech podobných aronii. [9] Sorbitol byl stanoven v aroniových výliscích v množství $3,65$ a $5,31 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. Hodnoty se liší v závislosti na použité extrakční metodě. [1] Jiný zdroj uvádí obsah sorbitolu $80 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ v čerstvé šťávě. [5] Sorbitol se používá jako náhradní sladidlo v potravinách s požadavkem na nízký obsah cukru. [11]

Sacharóza byla detekována ve výliscích a její obsah byl opět díky dvěma různým technikám extrakce odlišný: $3,75$ a $4,55 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. [1]

2.2.3 Minerální látky a vitaminy

Z minerálních látek jsou v aronii přítomny prvky: draslík, vápník, sodík, hořčík, zinek a železo (v sestupném pořadí podle množství). Jejich celkový obsah byl podle studie Kullinga a kol. stanoven na $440 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. [5] Jiní autoři našli 580 mg minerálních látek ve 100 g čerstvých plodů [2] Z vitaminů rozpustných ve vodě se v aronii nacházejí kyselina askorbová ($1,3$ - $27 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$), betakaroten ($0,77$ - $1,67 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$), skoro všechny vitaminy skupiny B (B1, B2, B3, B5 a B6), dále kyselina listová, v tucích rozpustný vitamin E i vitamin K- $580 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ čerstvých plodů. [5, 11, 14] Ve výliscích byl stanoven obsah vitamínu E na $152,3 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. [12]

2.2.4 Vlákna

Aroniové výlisky jsou bohatým zdrojem nerozpustné vlákniny s vysokým obsahem celulózy, hemicelulózy a ligninu. Celkové množství v čerstvých plodech je $5,62 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. [1, 5] Sójka a kol. ve své analýze udávají, že v aroniových výliscích je obsaženo 33% vlákniny. [2] Další polská studie z roku 2008 dokonce uvádí celkový obsah vlákniny ve výliscích $87,48 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. Nicméně zdůrazňují, že množství vlákniny závisí na metodách, jimiž je její obsah stanovován. [15]

Aronie má i velké množství pektinu, díky čemuž je velice vhodná pro výrobu marmelád a džemů. [11]

2.2.5 Lipidy

Na lipidy je aronie jako většina ovoce velmi chudá. Obsah tuků v čerstvých plodech aronie je $0,14 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. Při identifikaci hlavních komponent lipidů, plody aronie obsahovaly nejvíce kyselinu linolovou jakožto hlavní zástupkyni mastných kyselin. Obsah fosfolipidů, zastoupených především fosfatidylcholinem, fosfatidylinositem a fosfatidylethanolaminem je $2,8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$. Celkový obsah sterolu je $1,2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ v sušině, přičemž hlavní složkou je β -sitosterol, kampesterol a stigmasterol. [5, 11]

2.2.6 Organické kyseliny

Celkové množství organických kyselin je relativně nízké a pohybuje se v rozmezí 1-1,5 % v čerstvých plodech. Hlavními identifikovanými kyselinami jsou jablečná, vinná, citrónová, jantarová a fumarová kyselina. Obsah kyselin v připraveném džusu se pohyboval v rozmezí 5 až 19 g·l⁻¹ s L-jablečnou kyselinou jako hlavní složkou. [16] Jiné studie udávají, že největší zastoupení v aroniových výliscích má kyselina galakturonová (500 mg·100 g⁻¹) a kyselina jablečná je až druhá. Výskyt kyseliny galakturonové je spojený s přítomností pektinu v ovoci. [2]

2.2.7 Polyfenolické sloučeniny

Polyfenoly jsou častou složkou všech potravin rostlinného původu. Ovoce, zelenina, čaj, čokoláda, víno- to všechno jsou bohaté zdroje polyfenolů. Malvice aronie jsou známy jako rostlinný materiál s vysokým obsahem fenolů. Chemicky se jedná o sloučeniny, které obsahují několik hydroxylových skupin navázaných na benzenovém jádře. Polyfenoly jsou velmi různorodé a zahrnují několik podskupin, které se odlišují počtem fenolových kruhů. Hlavními podskupinami polyfenolů jsou flavonoidy, fenolové kyseliny, jednoduché fenoly, stilbeny a lignany. [16, 17]

Zástupci této chemické skupiny jsou mocnými antioxidanty, které chrání buňky proti volným radikálům. Podílí se také na preventivním působení proti vzniku kardiovaskulárních onemocnění. Konzumací aronie, která je na polyfenoly bohatá, se dá předcházet i tvorbě otoků, způsobených uvolněním histaminu při alergických reakcích. [4, 7, 18]

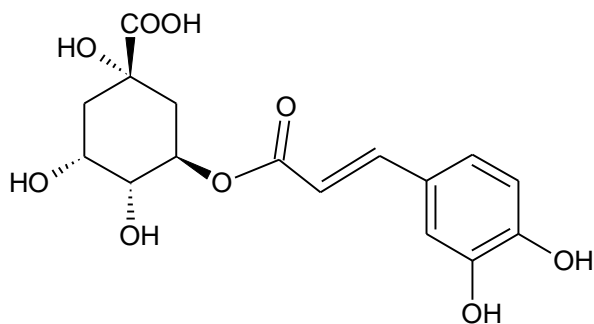
Celkový obsah fenolů v aronii se udává na více než 20 mg·g⁻¹. Obsah fenolů a i antioxidantní aktivita je u aronie vyšší než v borůvkách, ostružinách, malinách nebo brusinkách. [4, 7, 18] Ve studii Pieszka a kol. byla porovnávána antioxidantní aktivita ve výliscích z aronie, černého rybízu, jablek, jahod a mrkve. Nejvyšší schopnost zhaset volné radikály byla stanovena u výlisků z černého rybízu, na druhém místě pak byla aronie. [12]

2.3.1.1 Fenolické kyseliny

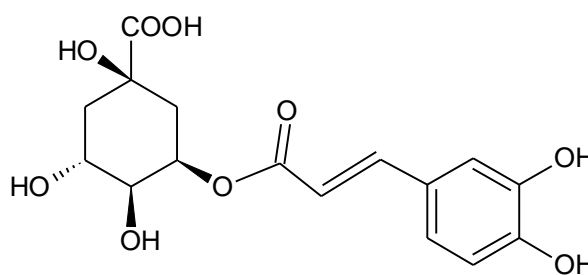
Fenolické kyseliny jsou sekundární rostlinné metabolity široce rozšířené napříč rostlinnou říší. Obecně název fenolové kyseliny označuje fenoly, které mají jednu karboxylovou funkční skupinu. Jedná se o hydroxylované deriváty benzoové a skořicové kyseliny. Tyto přirozeně se vyskytující kyseliny obsahují dva společné uhlíkaté rámce C6-C3 hydroxyskořicové a C6-C1 hydroxybenzoové struktury. Ačkoliv základní kostra zůstává stejná, čísla a pozice hydroxylových skupin na aromatickém kruhu jsou různá. Nejčastějšími zástupci, vycházejícími z kyseliny skořicové jsou p-kumarová kyselina, kávová kyselina, ferulová kyselina a sinapová kyselina, přičemž největší zastoupení má kyselina kávová. Často se také vyskytují jako konjugáty, např. s vinnou nebo chinovou kyselinou. Konjugáty chinové

kyseliny jsou obvykle uvedené jako chlorogenové kyseliny. Kyselina gallová je nejčastější fenolická kyselina, vycházející z kyseliny benzoové. [16, 19]

Obsah fenolových kyselin v čerstvých bobulích aronie je $96 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$, přičemž největší zastoupení mají kyseliny chlorogenová a neochlorogenová. Jejich pH je mezi 3,3 až 3,7. [16, 19] V usušených aroniových výliscích byl detekován obsah fenolických kyselin $630,3 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. [12]



kyselina chlorogenová

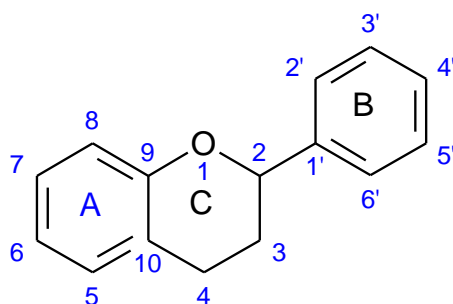


kyselina neochlorogenová

2.3.1.2 Flavonoidy

Flavonoidy jsou velkou skupinou rostlinných sekundárních metabolitů, jedná se o polyfenolické sloučeniny zahrnující 15 uhlíků se dvěma aromatickými kruhy (A a B) spojenými tříuhlíkovým řetězcem- uspořádání C6-C3-C6. Jsou nejpočetnější fenolovou skupinou a nachází se ve všech rostlinách. Odlišné koncentrace flavonoidů závisí na druhu rostliny, stupni vývoji, typu tkáně a na růstových podmínkách. V rostlinách mají řadu funkcí- jako antioxidanty, fotoreceptory, mají antibakteriální a antivirové účinky, dále zvyšují atraktivitu rostliny po vizuální stránce, slouží jako ochrana proti UV záření a také chrání rostlinu před patogeny. Flavonoidy se vyskytují hojně v ovoci a zelenině, které jsou součástí lidské výživy, a je odhadováno, že sníme alespoň jeden gram flavonoidů denně. Hlavní podskupinou flavonoidů jsou flavonoly, flavony, flavan-3-oly, anthokyanidiny, flavanony a isoflavony. Každá skupina flavonoidů má svoji unikátní chemickou vlastnost a jedinečné zastoupení v rostlinách. [16, 17]

Produkují škálu barev- od červené po fialovou (anthokyany), od bezbarvé po žlutou (flavonoly) a bezbarvou, která se změní po oxidaci na hnědou (flavanoly). [20]



struktura flavonoidu

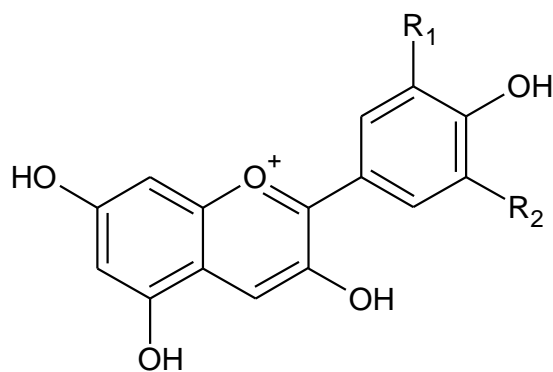
2.3.1.3 Anthokyanová barviva

Anthokyanany jsou přírodní ve vodě rozpustná barviva- jedná se o červené, oranžové, modré a fialové pigmenty, které se nachází v buněčných vakuolách rostlin. Jsou zodpovědné za zbarvení mnoha rostlin, ovoce a zeleniny a hrají v nich nespočet rolí. Jejich barva a silná UV absorbance vábí hmyz k opylování rostlin a také působí jako ochrana DNA před poškozením způsobeného UV zářením. [21]

Bylo popsáno více než 500 různých anthokyanů a za poslední dekádu byla podána zpráva o dalších nových strukturách anthokyanů. Jsou podskupinou polyfenolů, zvaných flavonoidy a v rostlinách se vyskytují přirozeně jako glykosidy. Počet anthokyanů nacházejících se v jednotlivých rostlinách je různý. To, že jsou tyto molekuly zodpovědné za zbarvení rostlin, poprvé objevil v roce 1939 Linus Carl Pauling. [22]

Chemicky se jedná o glykosidickou verzi anthokyanidinů s jedinečnou chemickou strukturou. Anthokyanidiny jsou polyhydroxy a polymethoxy deriváty flavyliového kationtu (2-fenylbenzopyrylium). Anthokyanidiny mají aromatický kruh spojený s heterocyklem s jedním atomem kyslíku, což tvoří flavyliový ion. Tyto dva slepené kruhy jsou spojené vazbou uhlík-uhlík k dalšímu aromatickému kruhu. Kruhy mohou mít násobné boční řetězce. Tyto postranní řetězce jsou obecně tvořeny vodíkem, hydroxylovými nebo methoxy skupinami. V dnešní době je známo 23 anthokyanidinů a v přírodě se samostatně nevyskytují- prakticky pouze v jejich glykosylované formě jako anthokyanany. Anthokyanany se tedy skládají z aglykonu (anthokyanidin), cukru/ů a v mnoha případech také z acylové/ých skupin/y. [23]

Nejvíce zastoupené anthokyanidiny v přírodě jsou *kyanidin*, *delphinidin* a *pelargonidin*. Rozložení šesti nejvíce se vyskytujících anthokyanidinů v ovoci a zelenině je následující: *kyanidin* 50 %, *delphinidin* 12 %, *pelargonidin* 12 %, *peonidin* 12 %, *petunidin* 7 % a *malvidin* 7 %. [4, 16] Hlavní rozdíl mezi anthokyanany je počet navázaných hydroxylových skupin a cukrů ke struktuře anthokyanidinu. [22]



struktura anthokyanidinů

Tab. 1: Nejčastěji se vyskytující anthokyanidiny [22]

Anthokyanidin	R ₁	R ₂
Kyanidin	OH	H
Delphinidin	OH	OH
Malvidin	OCH ₃	OCH ₃
Pelargonidin	H	H
Peonidin	OCH ₃	H
Petunidin	OCH ₃	OH

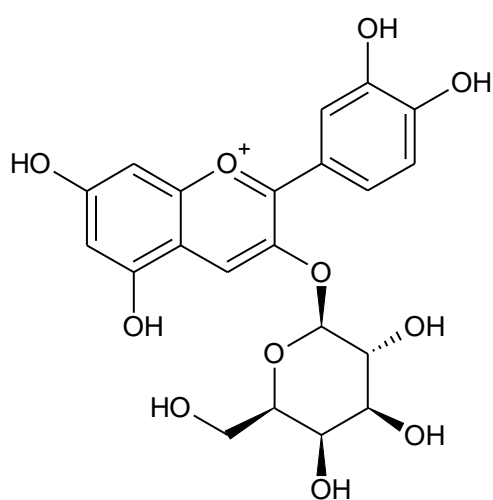
V aronii jsou 4 hlavní anthokyaniny zodpovědné za tmavě červené až fialové zbarvení a to jsou *kyanidin-3-galaktosid*, *kyanidin-3-glukosid*, *kyanidin-3-xylosid* a *kyanidin-3-arabinosid*. Izolované anthokyaniny jsou velice nestabilní a lehce degradují vzhledem k různým faktorům zahrnujícím: pH, teplotu skladování, světlo, kyslík, chemická struktura, koncentrace, přítomnost enzymů, proteinů a/nebo kovových iontů. V závislosti na pH roztoku se barva anthokyanů mění od červené přes modrou až na bezbarvou. Tato změna barvy je způsobená reakcí flavyliového iontu, který je stabilní v kyselých podmínkách. Ve chvíli, kdy dojde ke zvýšení pH, struktury vazby okolo flavyliového iontu se změni na bezbarvý carbinol okolo pH 4 a na fialovomodrý chinin při pH 6,5 a vyšším. [24]

Součástí molekuly anthokyanů bývá 5 sacharidů, které jsou vždy navázány v poloze C-3. Jedná se o D-galaktosu, D-glukosu, L-rhamnosu, L-arabinosu a D-xylosu. [17]

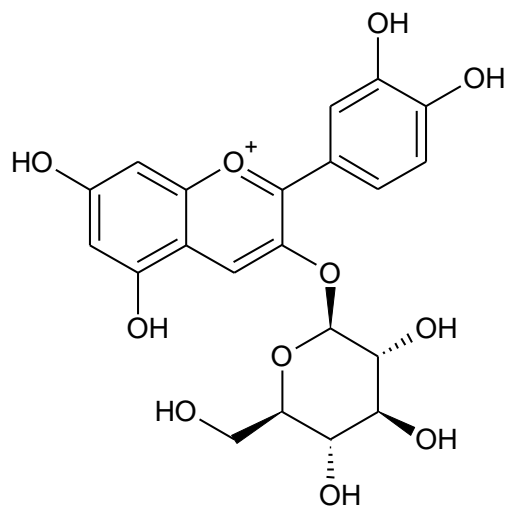
Denní příjem anthokyanů bývá odhadnut přibližně na 200 mg a je v porovnání s ostatními flavonoidy podstatně vyšší. [25] V čerstvých plodech bylo stanoveno množství anthokyanů na 1480 mg·100 g⁻¹. [23] Ve vyliscích aronie bylo detekováno nejvíce kyanidin-3-galaktosidu: 1535 mg·100 g⁻¹, dále kyanidin-3-arabinosidu: 680 mg·100 g⁻¹, kyanidin-3-xylosidu: 73,2 mg·100 g⁻¹ a nejméně kyanidin-3-glukosidu: 17,5 mg·100 g⁻¹. [1] V jiné dřívější studii byly všechny tyto hodnoty vyšší. [26]

Anthokyaniny mají vysokou antioxidační aktivitu, díky čemuž konzumací plodů aronie dochází ke snížení rizika výskytu kardiovaskulárních onemocnění a diabetu a také

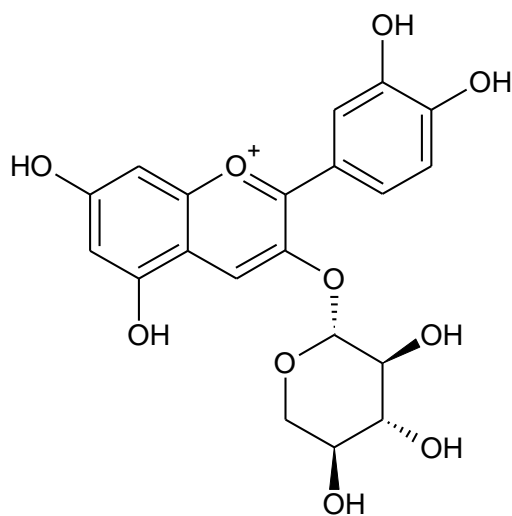
ke snižování hladiny škodlivého LDL cholesterolu. Anthokyany se také vyznačují antibakteriální a protizánětlivou aktivitou. [11, 16] Nepatří mezi tzv. základní živiny, tím pádem nejsou popsány žádné potíže spojené s nedostatkem. Studie provedené u lidí ukazují, že anthokyany se rychle vstřebávají, v krevním oběhu se totiž objevují pár minut po konzumaci. Maximální koncentrace v krvi je dosaženo po asi jedné hodině od konzumace. [27]



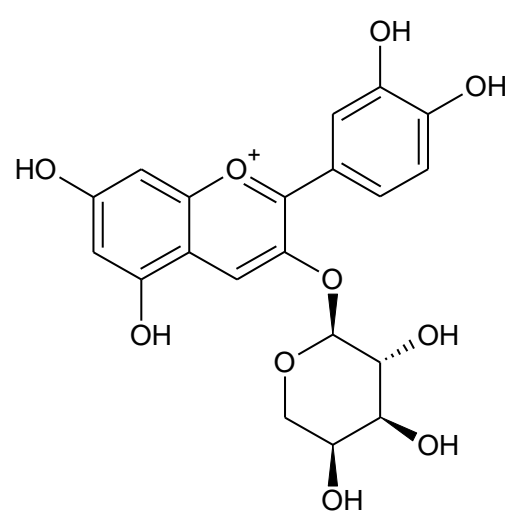
kyanidin-3-galaktosid



kyanidin-3-glukosid



kyanidin-3-xylosid

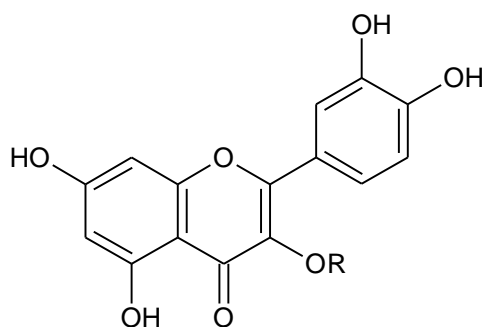


kyanidin-3-arabinosid

2.3.1.4 Flavonoly

Flavonoly jsou podskupinou flavonoidů a v aronii představují asi 1,5 % z celkového obsahu polyfenolických sloučenin. Nejčastěji se vyskytujícími flavonoly jsou kvercetin, kemferol a myricetin. [17] Pomocí metody ORAC byla u flavonolů prokázána vyšší antioxidační aktivita než u anthokyanů. [13] Aronie je bohatý zdroj derivátů kvercetinu. [28] Ve výliscích se nachází asi 126,9 mg·100 g⁻¹ flavonolů. [2] Jiná studie uvádí celkový obsah flavonolů

v čerstvých plodech $27 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$, což je značný rozdíl. [29] Obsah kvercetinů v aronii seřazených sestupně podle množství: kvercetin-3-galaktosid ($62,5 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$), kvercetin-3-glukosid ($37,4 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) a kvercetin-3-rutinosid ($15,7 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$), ve stopovém množství byl v aronie taktéž detekován kvercetin-3-vicianosid. [2]



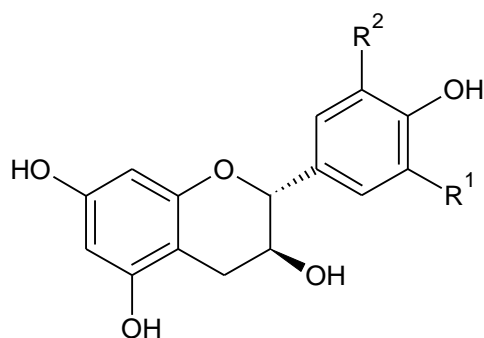
struktura kvercetinu

Tab. 2: Kvercetiny vyskytující se v aronii

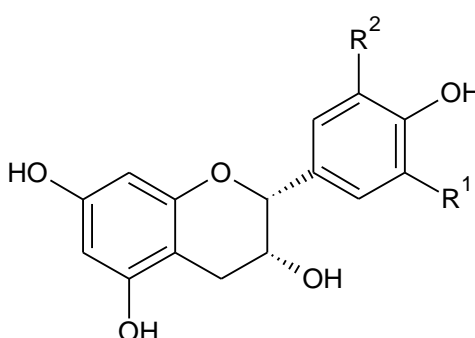
Kvercetin	R
Kvercetin-3-galaktosid	β -galaktosid
Kvercetin-3-glukosid	β -glukosid
Kvercetin-3-rutinosid	6'- α -rhamnosyl- β -glukosid

2.3.1.5 Flavanoly a proanthokyanidiny

Katechiny jsou klasifikovány jako monomery flavan-3-olu a jsou charakterizovány C6-C3-C6 kostrou s hydroxylovou skupinou na pozici 3 C kruhu se dvěma chirálními centry (jedno na uhlíku 2 a druhé na uhlíku 3) a tvoří tedy izomery. Katechin (obr. 2), epikatechin (obr. 3), gallokatechin (obr. 2), epigallokatechin (obr. 3) a jejich galloyly se všeobecně nachází v potravinách rostlinného původu. Monomerické flavanoly jsou biosyntetické prekurzory proanthokyanidinů, také nazývaných kondenzované třísloviny. Obsah katechinů v rostlinách je v jednotkách až stovkách $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. [16, 17]



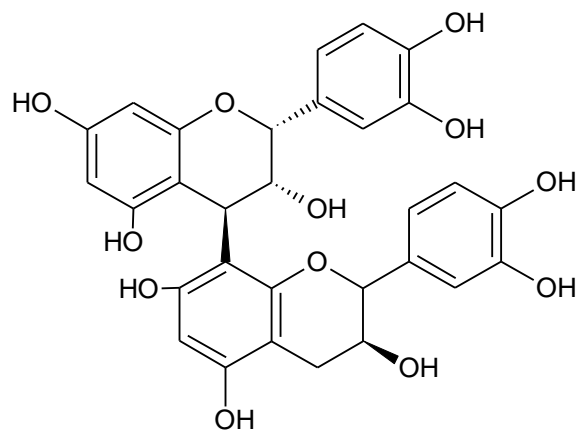
Obr. 2: (+)-katechiny, $R^1 = \text{OH}$, $R^2 = \text{H}$
 (+)-gallokatechiny, $R^1 = R^2 = \text{OH}$
 (+)-afzelechiny, $R^1 = R^2 = \text{H}$



Obr. 3: (-)-epikatechiny, $R^1 = \text{OH}$, $R^2 = \text{H}$
 (-)-epigallokatechiny, $R^1 = R^2 = \text{OH}$
 (-)-epiafzelechiny, $R^1 = R^2 = \text{H}$

Proanthokyanidiny jsou oligomery (dimery až pentamery) a polymery flavan-3-olu. Velikost molekuly proanthokyanidinů může být popsána stupněm jejich polymerace. Proanthokyanidiny, které se výhradně skládají z jednotek (epi)katechinu jsou označeny jako prokyanidiny, zatímco proanthokyanidiny obsahující (epi)afzelechin nebo (epi)gallokatechin podjednotky jsou nazývány propelargonidiny nebo prodelfinidiny. Nachází se především v ovoci, bobulovitých plodech, fazolích, ořeších, kakau a vínu. Proanthokyanidiny, jsou zodpovědné za svíravou chuť ovoce a nápojů (např. víno) a za hořkost čokolády. Nejčastějšími oligomery je „B řada“, B1 až B8 tvořeny dvěma jednotkami flavanolu buď katechinem nebo epikatechinem spojeny vazbou mezi C4 a C8 (B1 až B4 proanthokyanidiny), nebo vazbou mezi C4 a C6 (B5-B8 proanthokyanidiny). Nejméně časté dimery jsou z „A řady“, charakterizovány přítomností dvojných vazeb mezi dvěma flavanolovými jednotkami, jednou mezi C4 a C8 nebo mezi C4 a C6 a ta další mezi C2 a C5 nebo C7. Typ A proanthokyanidinů jsou méně časté v potravinách rostlinného původu, nicméně byla zjištěna jejich přítomnost v arašídech, mandlových slupkách a i v některých bobulovitých plodech, jako jsou například brusinky.

Proanthokyanidiny jsou obecně zkoumány s ohledem na jejich příznivé účinky v prevenci kardiovaskulárních onemocnění. Konzumace potravin bohatých na proanthokyanidiny, jako jsou červené víno a kakao (čokoláda), vede ke snížení krevního tlaku. Obsah proanthokyanidinů v aronii je $664 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. [7, 16, 17, 23]



dimerní proanthokyanidin B₁

2.3 Zdravotní účinky aronie

Plody aronie díky své vysoké antioxidační aktivitě a vysokému obsahu zdraví prospěšných látek jsou úspěšným bojovníkem proti civilizačním chorobám a vyznačují se antivirovými a antimikrobiálními účinky. Působí preventivně proti vzniku nádorových onemocnění, zpomalují stárnutí organismu, napomáhají správné funkci jater, snižují hladinu LDL cholesterolu, krevního tlaku a riziko výskytu kardiovaskulárních onemocnění. Polyfenolové

sloučeniny svými účinky totiž přispívají k obnově a ochraně buněk cévního endotelu. [4, 5, 25] Mají i ochranný potenciál proti neurodegenerativním chorobám a potlačují vznik cukrovky. [4, 25]

2.4 Využití aronie

Plody aronie se v dnešní době využívají především v potravinářském průmyslu k výrobě likérů, sirupů, vína, džemů (obr. 4), kompotů, čajů a k dochucování jogurtů. Dále existují i aroniové kapsle používající se jako doplněk stravy. Aronie se dá konzumovat i v sušené formě, i díky tomu, že tyto plody nejsou náchylné k napadání plísní či k bakteriální hnilobě. Díky vysokému obsahu anthokyanových barviv se aronie nejvíce využívá jako potravinářské barvivo- např. k dobarvování světlých vín a k celkovému zvýšení atraktivity produktů. Své uplatnění nachází i v kosmetickém průmyslu.

Při výrobě šťávy se často kombinuje aronie s jablky a vzniká až 16 % výlisků. [2]



Obr. 4: Vybrané produkty aronie [30]

2.5 Extrakce anthokyanů

Extrakce je separační metoda, kdy se ze směsi látek v jedné kapalině extrahuje složka do jiné kapalně fáze. Nejzákladnějším způsobem extrakce je použití dvou kapalných vzájemně nemísitelných fází, např. vody a hexanu. Podmínkou účinnosti extrakce je selektivní rozpustnost látek v použitých rozpouštědlech. [31]

Extrakce však může probíhat nejen mezi dvěma stejnými fázemi. Extrakční systémy lze rozčlenit podle skupenství fází, mezi kterými přechází složka:

- Z pevné fáze do kapaliny
- Z kapaliny do kapaliny
- Z kapaliny na pevnou fázi
- Z kapaliny nebo plynu na pevnou fázi

Moderním typem je vysokotlaká extrakce rozpouštědlem (PFE). Jedná se o fluidní extrakci za zvýšené teploty a tlaku a představuje rychlou a efektivní metodu extrakce pigmentů z rostlinných materiálů a zároveň šetrnou k životnímu prostředí. Zvýšený tlak udržuje rozpouštědlo v kapalném stavu nad jeho bodem varu a tím je možná extrakce za zvýšené teploty. Vyšší teplota zvýší rychlost difúze, rozpustnost, přesun hmoty ze sloučenin,lepší se kontakt analytu s rozpouštědlem a tím pádem může být extrakce dosaženo rychleji s nižší spotřebou rozpouštědla v porovnání s jinými extrakčními technikami. [34, 35]

Nadkritická fluidní extrakce (SFE) je samostatným druhem PFE. Při této technice se většinou využívá kapalný CO_2 za superkritických podmínek, tzn. teplota $>31\text{ }^\circ\text{C}$ a tlak $>7149\text{ kPa}$. V nadkritickém stavu se CO_2 chová jako ideální rozpouštědlo a poskytuje maximální výtěžnost extrakce. Tato metoda je vhodná pro nepolární látky z toho důvodu, že CO_2 je nepolární sloučenina. [32, 35]

Kolektiv Grunovaitého aplikoval PFE extrakci na zpracování aroniových výlisků. Nejvyšší výtěžnosti bylo dosaženo za použití methanolu v nadkritickém stavu. [1] Brazdauskas a kol. (2016) hodnotí PFE techniku jako lepší než využití SFE v extrakci anthokyanových barviv v aroniových výliscích. [32]



Obr. 5: Nekomerční přístroj pro extrakci kapalinou za zvýšeného tlaku

2.6 HPLC

Kapalinová chromatografie je analytická metoda, která odděluje analyty ve vzorku interakcí s kapalným rozpouštědlem na koloně naplněné stacionární fází. Každý analyt reaguje unikátně s mobilní a stacionární fází a prochází kolonou v různém tempu v závislosti na chování při oddělování. HPLC je určitý typ kapalinové chromatografie, která využívá počítačový systém se zařízením na dávkování vzorku, zásobníkem, odplyňovačem mobilní fáze, čerpadlem, dávkovací smyčkou, kolonou a detektorem. Mobilní fází je obvykle voda a směs dalších rozpouštědel, jako jsou acetonitril nebo methanol. Kolonové uspořádání umožňuje vysoce účinnou separaci.

HPLC se používá ve všech odvětvích jak výzkumu, tak i průmyslu tam, kde je potřeba vzájemně oddělit jednotlivé složky vzorku. Může být využita jak pro kvantitativní, tak i kvalitativní analýzu. Kvantitativní analýza využívá měřitelná data, kdežto kvalitativní využívá pozorovatelná a popisná data, která ale nejsou měřitelná. [4]

2.6.1 Teoretická východiska chromatografie

Celý chromatografický děj probíhá mezi stacionární a mobilní fází a je založen na pěti předpokladech:

- kolona je tvořena hypotetickými elementy (teoretickými patry), na nichž dochází k rovnováze,
- průtok je diskontinuální vždy o objem jednoho patra,
- rovnováha se ustavuje velmi rychle (kinetika je okamžitá),
- distribuční konstanta se nemění,
- nedochází k difúzi mezi jednotlivými patry.

Měřítkem účinnosti daného separačního systému je počet teoretických pater na délkovou jednotku kolony. Výsledkem lineárního chromatografického děje je pík, tj. křivka s gaussovským profilem. Všechny negativní vlivy v systému se projeví rozšířením (rozmytím) píku. [36]

2.6.2 Separační systémy v HPLC

2.6.2.1 Separace na normálních fázích (NP-LC)

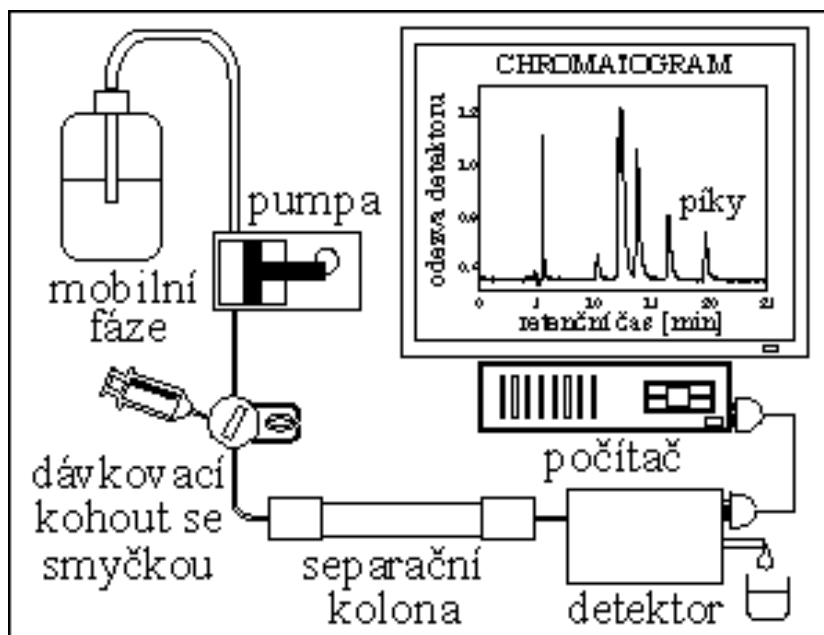
Stacionární fáze je v tomto systému polární, nejčastěji to bývá silikagel. Mobilní fází je nepolární rozpouštědlo nebo jejich směs, např. n-hexan, tetrachlormetan. Retence látek roste s rostoucí polaritou molekuly, protože nepolární látky se silikagelem neinteragují. V tomto systému budou jednotlivé typy sloučenin zadržovány v koloně v následujícím sestupném pořadí: karboxylové kyseliny > fenoly > alkoholy > primární aminy > ketony > nitrosloúčeniny > terciární aminy > halogenderiváty > alifatické uhlovodíky. [36]

2.6.2.2 Systém s obrácenými fázemi (RP-LC)

Tento systém je dnes nejpoužívanější. Až 80-90 % všech aplikací je analyzováno v tzv. reverzních systémech. Umožňují separovat analyty s širokým rozsahem polarity.

V reverzním systému je stacionární fáze nepolární. Používá se nejčastěji oktadecylovaný silikagel (tzv. kolony C₁₈) a oktylovaný silikagel (kolony C₈). Nejnovější jsou polymerní kombinované materiály plně porézní nebo s pevným jádrem potaženým porézní vrstvou. Jako mobilní fáze se využívá kombinace polárních rozpouštědel, např. voda a acetonitril nebo voda a methanol. Čím polárnější je mobilní fáze, tím menší má eluční sílu. Retence látek se zvětšuje s rostoucí nepolární částí molekuly. Eluční síla polárních rozpouštědel je následující: voda < methanol < acetonitril < propan-2-ol < tetrahydrofuran. Tyto polární směsi mohou také obsahovat příměsi buď kyselin anebo solí. Iontová síla totiž ovlivňuje vzájemné působení separovaných látek a stacionární fáze. [36]

2.6.3 Součásti kapalinového chromatografu



Obr. 6: Schéma HPLC [37]

2.6.3.1 Čerpadlo

Čerpadlo přivádí kapalnou mobilní fázi do kolony tak, aby nadávkování kapaliny proběhlo bez kolísání tlaku a se specifickou průtokovou rychlostí. Průtok bývá obvykle do 2 ml·min⁻¹. Tlak může být nastaven na jakoukoliv hodnotu mezi 30-50 MPa v závislosti na typu systému a použité koloně. Čerpadlo je poháněno elektromotory a jeho povrch je odolný vůči korozi. Kontinuální tok mobilní fáze zajišťují v současné době pouze čerpadla s malým objemem činné části. [4]

Důležitou funkcí čerpadla je jeho schopnost měnit složení mobilní fáze. Existují dva typy elucí: *isokratická* eluce znamená, že složení mobilní fáze je stejné po celou dobu analýzy. Stačí tedy jen jedno čerpadlo a jedna směs rozpouštědel jako mobilní fáze. Tento typ eluce se využívá pro separace jednodušších směsí látek.

Druhým typem je *gradientová* eluce. V tomto případě se v průběhu analýzy mění složení mobilní fáze. Nejméně ze dvou zásobních lahví se čerpá rozpouštědlo nebo směs rozpouštědel a v průběhu analýzy se mění jejich vzájemný poměr. Podle konstrukce čerpadla se gradient může tvořit v nízkotlaké části čerpadla nebo ve vysokotlaké části. Gradientová eluce je vhodnější pro komplexní vzorky s velkým počtem analýz. Využívá se např. pro látky s velkým rozdílem polarit. Dále poskytuje lepší rozlišení pro píky na začátku a na konci chromatogramu. Mezi její nevýhody patří: náročnější instrumentace (čerpadla), náročnější vývoj metody, delší doba analýzy vyplývající z nutnosti ekvibrace kolon. [36]

2.6.3.2 Odplynění

Plyn rozpuštěný v kapalině je pro HPLC nežádoucí. Mobilní fázi i dávkované vzorky je nutno důkladně odplyňovat. K odplynění se používá buď vakuum, ultrazvuková lázeň nebo membránový odplyňovač. Nejúčinnějším způsobem odplynění je probublávání mobilní fáze heliem. [33]

2.6.3.3 Dávkovací zařízení

Důležitou částí systému HPLC je dávkovací zařízení. Dávkovač injektuje malé množství kapalného vzorku na kolonu, do systému k analýze, kde se sloučeniny rozdělí na základě jejich polarity. Existují dva různé typy injektorů: manuální (dávkovací smyčka) a automatický. Manuální injektor je takový, kde uživatel přes šesticečný ventil dávkovací smyčkou dopraví vzorek o přesném objemu do toku mobilní fáze na kolonu. Pro větší série vzorků je výhodnější automatický dávkovač. Ten je spojen se zásobníkem vzorků, ve kterém jsou umístěny uzavřené vialky se vzorky. Vzorek se dávkuje mechanickým zařízením, které odměřuje dávkovaný vzorek prostřednictvím smyčky o přesném objemu. Tato technika umožňuje automatické užití celého systému bez nutnosti dozoru a je účinnější pro větší sadu vzorků. [4, 33]

2.6.3.4 Kolona

Kolona je jednou z nejdůležitějších částí HPLC, jelikož zde dochází k vzájemnému oddělování složek vzorku.

Kolony jsou vyrobeny z inertních materiálů, nejčastěji z kvalitní oceli nebo polymerního peeku. Musí odolávat poměrně vysokým tlakům a jejich vnitřní povrch musí být dostatečně hladký.

Analytické kolony mají délku od 1 do 30 cm a vnitřní průměr přibližně 1 až 5 mm. Kapilární kolony mají malé vnitřní průměry od 0,1 do 1 mm a mohou být různě dlouhé v závislosti na jejich použití. Nanokolony jsou nejmenší, s vnitřním průměrem menším než

0,1 mm a délkou kratší než 100 mm. Čím jsou kolony co do vnitřního průměru a délky menší, tím mohou detekovat menší množství hledaných látek.

Kapalinová chromatografie používá kolony, naplněné stacionární fází (sorbentem). Druh sorbentu určuje, o jaký typ chromatografie se jedná, zda jde o separaci v normálních nebo v reverzních fázích. Velikost částic stacionární fáze se pohybuje v rozmezí 1,7 až 10 μm .

Teplota kolony je další aspekt, který je potřeba brát v potaz k vytvoření reprodukovatelné analýzy. Na teplotě jsou závislé retenční časy analytů. Z toho důvodu je nutné kolonu umisťovat do termostatu, který zajistí konstantní teplotu v koloně po dobu celé analýzy. [33]

2.6.3.5 Detektor

Další nezbytnou součástí HPLC systému je detektor, který reaguje na změny složení eluátu vystupujícího z kolony. Umožňuje kvalitativní a kvantitativní analýzu všech složek zkoumaného vzorku. Složky jsou identifikovány jejich retenčním časem, který je jedinečný pro jednotlivé sloučeniny v daném separačním systému. Poté mohou být kvantifikovány za použití celkové oblasti píku k vypočítání koncentrace v původním produktu. Existuje mnoho technik detekce, které mohou být aplikovány, ze kterých jsou nejužívanější spektrografické, index zlomu a detekce fluorescence. [4, 33]

Spektrofotometrický detektor (UV-VIS detektor)

Jedná se o základní, nejrozšířenější a nejpobulárnější selektivní detektor. Detekovaná látka musí absorbovat záření použité vlnové délky- měří se tedy absorbance eluátu vycházejícího z kolony. Ke kvantitativnímu vyhodnocení se využívá Lambert-Beerův zákon.

Konstrukčně se jedná o detektory s fixní vlnovou délkou, s proměnnou vlnovou délkou, s programovatelnou vlnovou délkou a detektory se současným záznamem spektra (diode-array detektor). [33, 36]

Fluorimetrický (fluorescenční) detektor

Signál poskytují látky vykazující fluorescenci. Absorbované UV záření je částečně emitováno fluorescenčním zářením o nižší energii. Tento detektor je vysoce selektivní a citlivý.

Konstrukčně jde buď o jednoduchý systém s Hg-výbojkou, monochromátorem s detekcí všech emitovaných vlnových délek. Nebo o složitější systémy používající monochromátor i pro snímání emitovaného záření, což má za následek větší selektivitu. Fluorescenční záření se měří v pravém úhlu, nepoužívá se fotodioda, ale fotonásobič, který má velké zesílení. Je velice vhodný pro analýzu složitějších matric, zejména pro analýzu polycyklických aromatických uhlovodíků. [4, 33, 36]

Elektrochemický detektor

Pracuje na principu měření proudu vyvolaného při průchodu elektroaktivní látky mezi pomocnou a pracovní elektrodou, na něž je vloženo pracovní napětí. Jedná se o selektivní, destruktivní detektor s velmi vysokou citlivostí detekce. Používá se pro sloučeniny, které

mohou být oxidovány nebo redukovány, neboť elektrochemicky inaktivní látky neposkytují signál. Má vysoké nároky na čistotu mobilní fáze, která musí být vodivá. [33, 36]

Refraktometrický detektor (D. inflexních lomů)

Patří mezi univerzální, neselektivní a ne příliš citlivé detektory. Odezva je dána rozdílem indexu lomu čisté mobilní fáze ve srovnávací cele a analytu v měrné cele. Vzorek prochází dvěma kyvetami: měrnou a referentní (srovnávací), přičemž dojde ke změně úhlu lomu paprsku. Zdrojem paprsku je polychromatické světlo.

Detektor má vysoké meze detekce, tím pádem není vhodný pro stopové analýzy. Nevýhodou je velká teplotní závislost a nelze jej použít s gradientem. Využívá se např. pro stanovení sacharidů. [33, 36]

Vodivostní detektor

Je to univerzální, neselektivní detektor. Jeho odezva je dána elektrickou vodivostí eluátu mezi dvěma elektrodami, na které se vkládá střídavé napětí.

Je vhodný pro detekci iontů, je citlivý a závisí na změnách teploty. Na mobilní fázi jsou kladeny vysoké nároky, měla by být co nejméně vodivá, zato s velkou permitivitou. Optimální spojení tohoto detektoru je s iontově-výměnnou chromatografií (IEC). [33]

2.6.3.6 Počítač

Poslední část HPLC systému je počítač, který řídí všechny další části chromatografu a sbírá data, která zaznamenává formou chromatogramu. Staví detekční techniku proti retenčnímu času a tím umožňuje identifikaci a kvantifikaci analytů. Přítomnost hledaného analytu musí být ověřena porovnáním se standardem o známé koncentraci. Jakmile jsou data shromážděna, mohou být identifikovány a kvantifikovány složky ve vzorku. [4]

2.7 Stanovení anthokyanových barviv metodou HPLC

V roce 2014 analyzovali Wu, Gu, Prior a McKay anthokyanany. Pracovali na HP 1100 series HPLC (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) s detektorem s diodovým polem. Pro separaci byla použita kolona Zorbax SB-C18 (250 x 4,6 mm). Mobilní fáze A byl 5 % vodný roztok kyseliny mravenčí a mobilní fáze B byl methanol. Průtok byl nastaven na 1 ml·min⁻¹ a detekce byla při 520 nm. Gradient byl následující: 5 % B, 0-2 min; 5-20 % B, 2-10 min; 20 % B, 10-15 min; 20-30 % B, 15-30 min; 30 % B, 30-35 min; 30-45 % B, 35-50 min; 45 % B, 50-55 min; 45-5 % B, 55-65 min; 5 % B, 65-68 min. Nízkorozlišovací hmotnostní spektrometrie s elektrosprejem jako ionizační technikou byla provedena na Esquire-LC hmotnostním spektrometru (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). Pro kvantifikaci a identifikaci byla ze směsi anthokyanových standardů (3-glukosid delphinidinu, kyanidinu, petunidinu, pelargonidinu, peonidinu a malvidinu) vytvořena kalibrační křivka jednotlivých anthokyanů. [23]

Slimestad a kol. (2005) analyzovali 4 vzorky na obsah flavonoidů. Vzorky byly extrahovány 5 x 200 ml methanolem (0,1 % HCl, v/v po dobu 6 hodin, poté byly extrakty smíchány). 20 μ l těchto extraktů bylo ihned nadávkováno do HPLC systému. Separace bylo dosaženo na koloně Hypersil ODS (125 x 3 mm, 3 μ m, Agilent Technologies) zapojené v HPLC Waters 2690 s PDA detektorem (Waters, 996). Dvousložkový systém mobilních fází se skládal z (A): 0,5 % vodný roztok TFA a (B): 0,5 % TFA v acetonitrilu. Gradient (B v A) byl lineární od 10 % do 15 % 10 min, od 15 % do 20 % 20 min, od 20 % do 40 % 1 min, isokratická eluce 4 min a nakonec zpět ze 40 % na 10 % 1 min. Průtok byl 1 ml/min a vždy bylo nadávkováno množství 10 μ l. Termostat kolony byl nastaven na 25 °C. Spektra byla měřena v rozpětí 240-600 nm. [18]

Wiczkowski a kol. (2010) stanovovali anthokyaniny na HPLC systému (Shimadzu, Kyoto, Japan) vybaveného kolonou Synergi 4 μ m Polar-RP 80A (250 x 4,6 mm; Phenomenex, USA). HPLC systém byl složen ze dvou čerpadel (LC-10 AD_{VP}), detektoru s diodovým polem (SPD-M10 A_{VP}) nastaveného na 520 nm, MS detektoru s jedním kvadrupólem (QP8000 α), automatického dávkovače (SIL-10, AV_{DP}), termostatu kolony (CTO-10, AS_{VP}) a ovládání systému (SCL-10, A_{VP}). Všechna chromatografická stanovení byla provedena při 37 °C s průtokem 1 ml·min⁻¹ mobilní fáze, přičemž dávkovali 20 μ l vzorku. Byla využita gradientová eluce s mobilní fází A (4 % vodný roztok kyseliny mravenčí) a mobilní fází B (4 % roztok kyseliny mravenčí v acetonitrilu) s následujícím programem: 8-16-23-40-80-8-8 % B v časech t_G = 0-18-26-40-45-50-60 min. Anthokyaniny byly identifikovány porovnáním s jejich retenčními časy a UV-VIS spektry. Hmotnostní spektrometr s elektrosprejem (ESI) jako ionizační technikou měl následujícími parametry: teplota CDL 150 °C, napětí CDL 10 V, napětí sondy 5 kV, průtok rozprašovače plynu (N₂) 4 ml·min⁻¹. Kvantifikace všech anthokyaninů byla vyjádřena jako ekvivalenty kyanidin-3-galaktosidu. [25]

Taheri a kol. (2013) stanovovali polyfenoly na kombinaci UHPLC a MS. Chromatograf Nexera firmy Shimadzu byl vybavený odplyňovačem DGU-20A5, autosamplrem SIL-30AC, detektorem s diodovým polem SPD-M20A, kvadrupólovým hmotnostním spektrometrem LCMS-2020 s iontovým zdrojem DUal Ion Source (DUIS), (Columbia, MD, USA) a dusíkovým plynovým generátorem Nitroflowlab (Parker-Balston, Haverhill, MA, USA). Vzorky o objemu 1 μ l byly dávkovány na kolonu Kinetex PFP 100A (2,1 x 50 mm, velikost částic 1,7 μ m; Phenomenex Inc. Torrance, CA, USA) a eluovány mobilní fázemi: A: 5 % vodný roztok kyseliny mravenčí a B: 30 % vodný roztok methanolu s průtokem 0,2 ml·min⁻¹. Podmínky gradientu: 20 % B, od 0-6 min; 20-50 % B, 6-12 min; snížení na 20 % B, více než 2 min; a 4 min ekvilibrace kolony na 20 % B. Polyfenoly byly identifikovány na základě porovnání se standardy, s hmotnostními spektry a s UV spektry. Anthokyaniny byly kvantifikovány při vlnové délce 520 nm. [38]

Lee a kol. (2014) stanovovali polyfenoly na HPLC-MS/MS. Použili k tomu kolonu ZORBAX Eclipse XDB-C18 (250 x 4,6 mm, velikost částic 5 μ m) s mobilními fázemi: A:

0,1 % vodný roztok kyseliny mravenčí a B: methanol:voda (6:4, v/v) s obsahem 0,1 % kyseliny mravenčí. Gradient byl podle schématu: 0-50 % B po dobu 10 minut, zvýšení na 70 % B přes 50 minut, snížení na 0 % B následujících 10 minut a poté izokratická eluce 10 minut. Jednotlivé složky byly kvantifikovány pomocí kalibračních křivek. [39]

Wangensteen a kol. (2014) provedli analýzu anthokyanů a proanthokyanidinů na chromatografu LaChrom Elite HPLC (VWR-Hitachi) vybavené detektorem s diodovým polem L-2455. Pro separaci byla použita monolitická kolona Chromolith Performance RP18e (100 x 4,6 mm; Merck, Darmstadt, Germany). Byl použit gradient mobilní fáze A: 0,5 % vodný roztok kyseliny trifluoroctové a mobilní fáze B: 0,5 % roztok kyseliny trifluoroctové v acetonitrilu s následujícím časovým harmonogramem: 10 % B, 0-1 min; 10-20 % B, 1-3 min; 20-85 % B, 3-4 min; 85-10 % B, 4-5 min a nakonec 10 % B, 5-6 min. Průtok byl $3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a objem nástřiku $10 \text{ } \mu\text{l}$. Absorbance anthokyanů byla zaznamenána při 520 nm a separace probíhala při 25 °C. Kvantifikace anthokyanů byla založena na kalibrační křivce čistého kyanidinu-3-galaktosidu izolovaného z aronie. [7]

Kyle M. R. ke své analýze anthokyanů využil HPLC systém (Dionex 3000, Pittsburgh, PA, USA). Jako kolony použil Phenomenex Gemini C6 Phenyl (250 x 4,6 mm, 5 μm), Phenomenex Jupiter C-18 (250 x 4,6 mm, 5 μm) a Phenomenex Gemini-NX C18 110A (250 x 4,6 mm, 5 μm). Průtok mobilní fáze byl nastaven na $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, dávkovaný vzorek měl objem $5 \text{ } \mu\text{l}$ a teplota kolony byla nastavena na $35 \pm 0,5 \text{ } ^\circ\text{C}$. Vlnová délka UV-VIS detekce byla nastavena na 520 nm. Gradient: 3 minuty, 95 % B (0,1 % TFA), od 3. do 25. minuty: lineární gradient na 5 % B a od 25. do 30. minuty byla kolona reekvalibrována na 95 % B. [4]

Vlachojannis a kol. (2015) použili pro stanovení anthokyanů HPLC systém Acquity UPLC (Waters, Milford, MA, USA). Ten byl tvořen dvěma čerpadly (BSM), autosamplerem (SM) chlazeným na 10 °C, detektorem s diodovým polem (PDA). Detektor snímal spektra v rozsahu od 190 do 520 nm. Druhým detektorem byl trojitý kvadrupólový hmotnostní spektrometr Acquity TQD s elektrosprejem. Anthokyaniny byly separovány na koloně Acquity HSS-T3 RP18 (150 x 2,1 mm, velikost částic 1,8 μm). Mobilní fáze A byla 1 % vodný roztok kyseliny mravenčí a mobilní fáze B: acetonitril s 0,1 % kyselinou mravenčí. Program gradientu byl následující: 0 min: 0 % B; 0-2 min: 5 % B; 23 min: 28 % B; 23,5 min: 98 % B; 25 min: 98 % B; 25,5 min: 1 % B a 27,5 min: 0 % B. Průtok mobilní fáze byl nastaven na $0,4 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Celý systém byl řízen softwarem MassLynx 4,1 (Waters Corporation, Milford, MA, USA). [29]

Pieszka a kol. (2015) využili ke stanovení fenolických sloučenin HPLC Shimadzu LC-10AS s SPD-10AV detektorem, kolonou LiChrospher 250 mm RP18 5 μm a s mobilní fází voda-methanol s přísadkou H_3PO_4 . K extrakci byl využit 80 % ethanol. [12]

Vagiri M. a Jensen M. (2016) stanovovali anthokyaniny v aroniových výliscích. Kapalinový chromatograf Dionex Ultimate 3000 (Dionex, CA, USA) byl řízen softwarem Chromeleon (verze 6.8). Mobilní fáze A byla složena z acetonitrilu a 0,1 % trifluoroctové kyseliny a mobilní fáze B byla 0,5 % trifluoroctová kyselina. Gradient byl nastaven na 0-5

min, 92 % B; 5-12 min, 92-87 % B; 12-23 min, 87-75 % B; 23-28 min, 75-60 % B a 28-30 min zpět na 92 % B s následnou 5 minutovou reekvilibrací systému s výchozími podmínkami. Průtok mobilní fáze byl nastaven na $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a celkový čas analýzy trval 35 min. Objem dávkovaného vzorku byl $10 \text{ } \mu\text{l}$. Byla použita kolona Gemini C18 ($150 \times 4,6 \text{ mm}$, velikost částic $5 \text{ } \mu\text{m}$). Identifikace monomerních anthokyanů byla provedena porovnáním jejich spektrálních dat (520 nm) s dostupnou literaturou a retenčními časy vztahujícími se ke standardům. Kvantifikace kyanidinu-3-galaktosidu, kyanidinu-3-glukosidu a kyanidinu-3-arabinosidu byla založena na kalibrační křivce jejich vlastních čistých standardů, zatímco kyanidin-3-xylosid byl kvantifikován jako ekvivalent ke kyanidin-3-glukosidu. [40]

Brazdauskas a kol. (2016) stanovovali anthokyany a porovnávali dva separační systémy: reverzní systém s plně porézní aminofází v koloně Hypersil a kolonu Ascentis Express C₁₈ plněnou sorbentem s pevným jádrem. Prvním systémem byl: Agilent 1200 series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) vybavený autosamplerem. Separace na tomto přístroji byla provedena na amino koloně Hypersil GOLD ($150 \times 1 \text{ mm} \times 3 \text{ } \mu\text{m}$, Thermo Scientific, Waltham, MA). Mobilní fáze byly (A): acetonitril/mravenčí kyselina, 99:1 (v/v) a (B): voda/mravenčí kyselina, 95:5 (v/v) eluovány podle následujícího gradientu: 0 min, 1 % B; 60 min, 30 % B; 65 min, 40 % B; 75 min, 90 % B. Průtok byl nastaven na $18 \text{ } \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$ a objem dávkovaného vzorku $7 \text{ } \mu\text{l}$ za současného udržování teploty kolony na $25 \text{ } ^\circ\text{C}$. Druhým kapalinovým chromatografem byl Agilent 1290 Infinity s částečně porézní kolonou Ascentis Express C₁₈ ($50 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$, $2,7 \text{ } \mu\text{m}$, Supelco, Bellefonte, CA). Jako mobilní fáze byly využity (A): voda + 0,1 % mravenčí kyselina a (B): acetonitril s průtokem $3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Gradient byl následující: 0 min, 0 % B; 0,1 min, 5 % B; 0,3 min, 15 % B; 0,7 min, 40 % B; 0,9 min, 50 % B; 1 min, 90 % B. Kolona byla termostatována na $25 \text{ } ^\circ\text{C}$ a monitorována při vlnových délkách 280 a 254 nm v DAD, zatímco UV-vis spektra byla shromážděna od 190 do 550 nm během celé analýzy. [32]

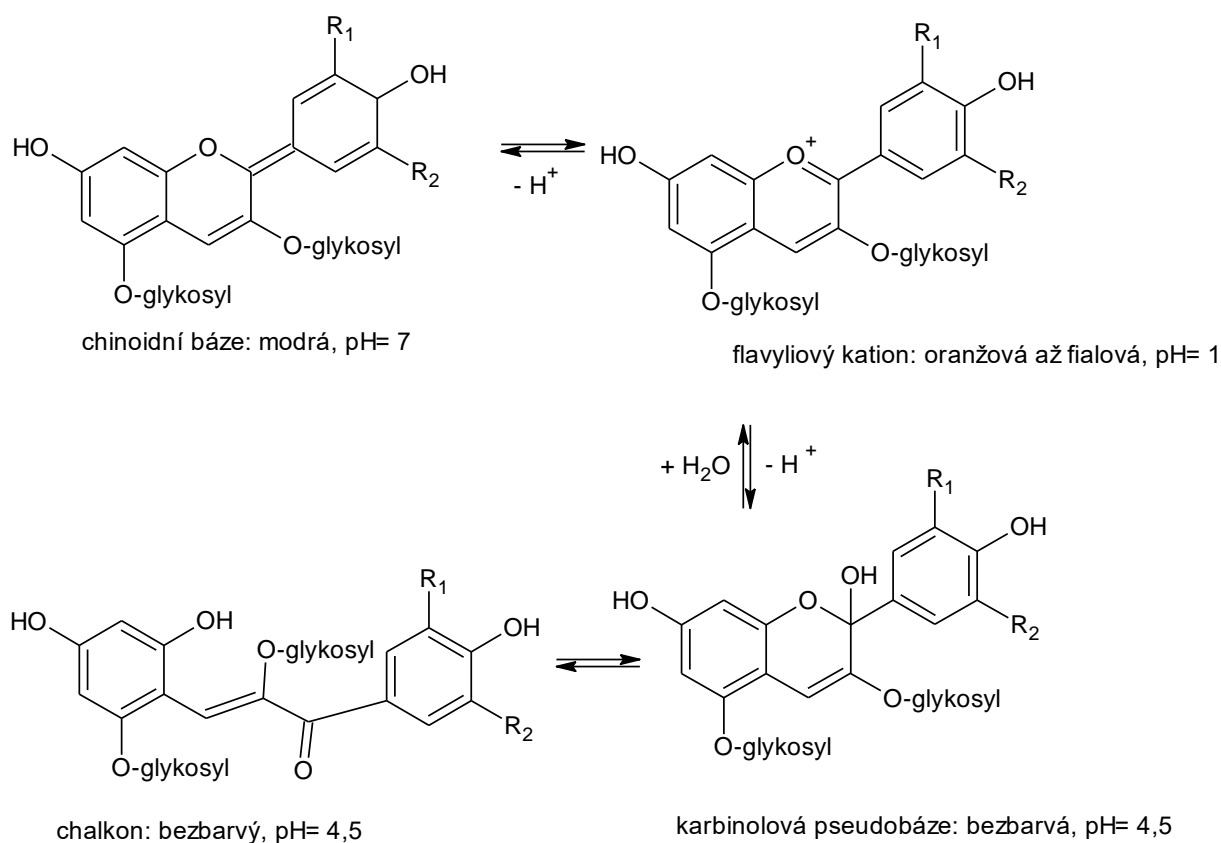
Ćujić a kol. (2016) provedli analýzu anthokyanů na Agilent Series 1200 RR HPLC (Agilent, Waldbronn, Germany) s detektorem s diodovým polem za použití kolony Lichrospher RP-18 ($250 \times 4 \text{ mm}$, velikost částic $5 \text{ } \mu\text{m}$; Agilent). Mobilní fáze A byla 10 % vodný roztok kyseliny mravenčí a B: acetonitril. Vzorky byly separovány gradientovou elucí podle následujícího schématu: 1 % B, 0-0,5 min; 1-7 % B, 0,5-1 min; 7 % B, 1-4 min; 7-10 % B, 4-7,5 min; 10-14 % B, 7,5-11,5 min; 14-25 % B, 11,5-15,5 min; 25-40 % B, 15,5-18,5 min; 40-75 % B, 18,5-22 min; 75 % B, 22-25 min. Průtok mobilní fáze byl nastaven na $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Analyty byly detekovány při 520 nm. Kvantifikace byla provedena použitím kalibrační křivky standardů kyanidinu-3-galaktosidu, kyanidinu-3-glukosidu a kyanidinu-3-arabinosidu. Všechny experimenty byly opakovány nejméně třikrát. Výsledky byly vyjádřeny jako průměrná hodnota \pm směrodatná odchylka v mg na g sušiny. [41]

2.8 Stanovení anthokyanů pH diferenciální metodou

Anthokyanová barviva podléhají reverzibilní strukturální změně při změně pH (obr. 7) projevující se nápadně rozdílnými absorpčními spektry. Tato změna struktury je sledována spektrofotometricky při dvou vlnových délkách.

Barevný flavyliový kation převažuje při pH 1 a bezbarvá karbinolová pseudobáze při pH 4,5. pH diferenciální metoda je založena na této reakci a umožňuje přesné a rychlé měření celkových anthokyanů dokonce i v přítomnosti polymerních degradovaných pigmentů a dalších sloučenin. [43, 44]

Tato metoda byla poprvé představena v roce 1948 E. Sondheimerem a Z. I. Kerteszem.[43]



Obr. 7: Převládající strukturální formy anthokyanů při různém pH [43]

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Laboratorní vybavení

3.1.1 Chemikálie

- acetonitril, Lab-Scan, POCH SA, Gliwice, Polsko
- kyselina mravenčí 98-100 %, Merck KGaA, Německo
- destilovaná voda, FCH VUT Brno, Česká republika
- ethanol Absolute, Sigma-Aldrich, Německo
- quercetin \geq 98 %, Sigma-Aldrich, Německo
- kyselina gallová, Sigma-Aldrich, Švýcarsko
- kyselina vanilová, Sigma Aldrich, Čína
- kyselina kumarová \geq 98 %, Sigma Aldrich, Velká Británie
- katechin \geq 98 %, Sigma Aldrich, Čína
- kyselina ferrulová, Sigma Aldrich, Čína
- D-fruktosa, Lachema, a.s., Brno, Česká republika
- D-glukosa, Sigma Aldrich, Francie
- chlorid draselný, KCl, p.a., Lachema, a.s., Brno, Česká republika
- octan sodný, CH₃COONa p.a., Lachema, a.s., Brno, Česká republika
- kyselina octová, Lach-Ner s.r.o., Neratovice, Česká republika
- kyselina chlorovodíková, Lach-Ner s.r.o., Neratovice, Česká republika

3.1.2 Pomůcky

- mikrofiltry, 0,45 μ m, Chromservis ČR
- mlýnek Porkert 5
- laboratorní sklo
- alobal
- zátky
- balonek
- stříkačka
- třecí miska s tloučkem
- vialky
- pipety

3.1.3 Přístroje

- analytické váhy Ohaus Corp., Pine Brook, NJ, USA
- pH metr s příslušenstvím, model pH50
- ultrazvuková čistička, Kraintek, Slovensko
- chladnička s mrazničkou Goddess

- Agilent Infinity 1260
- kolona EVO Kinetex 2,6 μm C-18 RP 100A 150 x 4,6 mm
- kolona Prevail Carbohydrate ES 5u 250 x 4,6 mm
- sušárna
- exsikátor
- UV/VIS spektrofotometr Helios Gamma

3.2 Příprava vzorků

Plody aronie pocházejí od soukromého pěstitele z obce Pavlov na Vysočině. Ihned po sběru v září 2016 byly uchovány v mrazicím boxu při teplotě $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do doby práce v laboratoři. Po jejich vytažení jsem je nechala volně rozmraznout, následně je pomlela v mlýnku a ze vzniklé směsi jsem ručně přes plátno vymačkala všechnu šťávu. Část výlisků byla usušena v sušárně při teplotě do $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, z čehož určitý podíl byl pomlet v třecí misce s tloučkem.

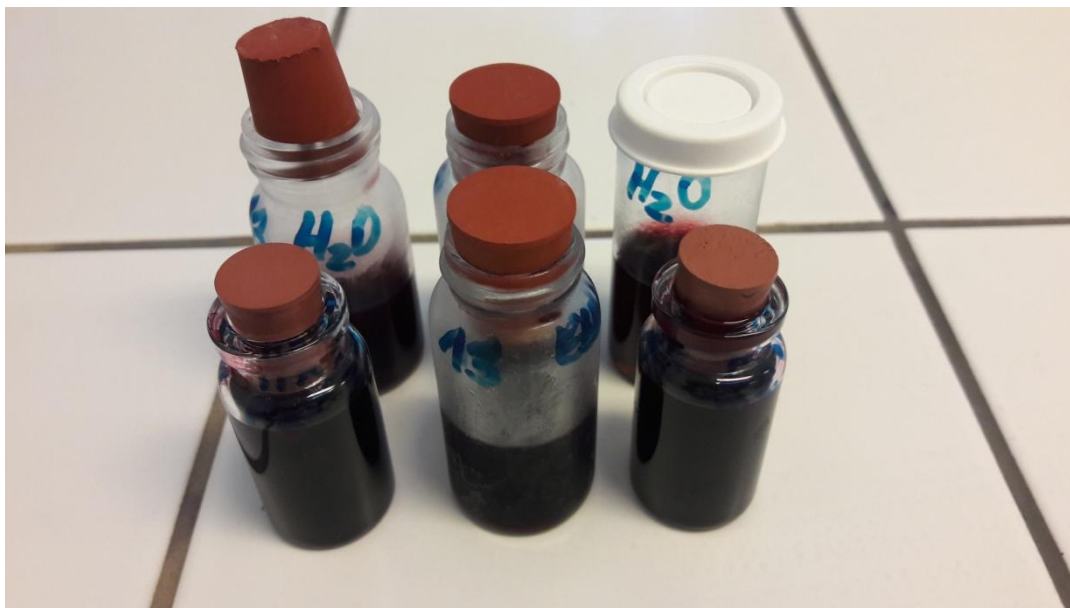
Ke stanovení sacharidů byly všechny vzorky kromě čisté aroniové šťávy ředěny 20x. Vymačkaná aroniová šťáva byla zředěna 45x.

K analýze polyfenolických sloučenin nebyly extrakty ředěny, byl rovnou odebrán finální vzorek (1 ml) a přes mikrofiltr nadávkován do vialek a postoupen dále k analýze HPLC.

3.2.1 Extrakce

Výlisky byly ponechány volně, aby rozmrzly. Poté jsem navážila 3x 25 g do Erlenmeyerových baněk, do jedné jsem nalila 100 ml destilované vody, do druhé směs ethanolu a vody (50 + 50 ml) a do třetí 100 ml EtOH. Hrdlo baněk bylo přikryté alobalem a ty byly ponechány v pokojové teplotě ve skřínce bez přístupu světla. Dále byla provedena extrakce vysušených (14 g) a pomletých (5 g) výlisků, které byly extrahovány již jen buď samotnou vodou anebo směsí ethanolu a vody. Extrakty (10 ml) jsem odebrala po 13 a 14 hodinách na základě doporučení z předcházejících experimentů. [45] Extrakty nebyly naředěny, byl jen odebrán finální vzorek (1 ml) a přes mikrofiltr nadávkován do vialek a postoupen dále k analýze.

U dvou vzorků byla provedena vysokotlaká extrakce směsí rozpouštědel (PFE) v extraktoru *onePSE* (applied Separations, Allentown, PA, USA). Byl použit 1 g usušených a 1 g nadrcených výlisků, které byly spolu s balotinou (skleněné mikrokuličky o velikosti 500-700 μm) dány do extrakční patry o objemu 11 ml. Jako rozpouštědlo byla zvolena směs EtOH:voda (50:50) při teplotě $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a tlaku 150 barů (15 MPa). Extrahovalo se 3 x 5 min. Mezi jednotlivými cykly došlo k proplachu dusíkem (20 s) a po ukončení extrakce (60 s). Finální extrakt byl poté skladován v ledničce a postoupen k dalšímu měření.



Obr. 8: Ukázka vybraných extraktů z výlisků aronie

3.3 Měření

Všechny vzorky byly stanovovány 2x. U každého vzorku byl pomocí MS Excel vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Jako rozpouštědla byla využita destilovaná voda (V), kombinace ethanolu a destilované vody (EtOH + V) v poměru 50:50 a u čerstvých plodů i samotný ethanol.

3.3.1 Analýza polyfenolových sloučenin

Měření bylo provedeno na kapalinovém chromatografu Agilent Infinity 1260 (obr. 9) s DAD detektorem (detekce diodovým polem). K analýze bylo dávkováno 5 μl vzorku. Polyfenoly byly stanoveny na koloně EVO Kinetex C-18 RP 100A (150 x 4,6 mm, velikost částic 2,6 μm). Teplota termostatu byla nastavena na 40 °C. Analýza každého vzorku trvala 65 min. Jako mobilní fáze byly použity 2,5 % roztok kyseliny mravenčí (A) a acetonitril (B). Látky byly detekovány při vlnových délkách 350 nm, 320 nm, 290 nm a 280 nm. Při separaci byla využita gradientová eluce s průtokem mobilní fáze 0,75 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Podmínky gradientu byly následující: 92 % A a 8 % B 0-15 min; 88 % A a 12 % B, 15-25 min; 85 % A a 15 % B, 25-30 min; 80 % A a 20 % B, 30-40 min; 92 % A a 8 % B, 40-43 min. Měření bylo provedeno se směsným roztokem standardních látek o koncentraci 4 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Kvantitativní údaje byly

získány integrací rekonstruovaných iontových chromatogramů a dále byly vyhodnoceny plochy ve vzorcích a standardech.

3.3.2 Analýza sacharidů

Měření bylo provedeno na kapalinovém chromatografu Agilent Infinity 1260 s ELSD detektorem. Sacharidy byly stanoveny na koloně Prevail Carbohydrate ES 5u (250 x 4,6 mm). Teplota kolony byla nastavena na 35 °C. Mobilní fáze byla složena z destilované vody (A) a acetonitrilu (B) v poměru 25:75. Průtok mobilní fáze byl 1 ml·min⁻¹. Analýza jednoho vzorku trvala 30 min. K analýze bylo vždy nadávkováno 10 μl vzorku. Vypařovací teplota: 65 °C a zmlžovací teplota: 95 °C. Průtok dusíku: 1,3 l·min⁻¹. K identifikaci a kvantifikaci byly použity standardy glukózy, fruktózy a sacharózy, přičemž sacharóza v mých vzorcích detekována nebyla.



Obr. 9: Kapalinový chromatograf Agilent Infinity 1260

3.3.3 Stanovení anthokyanových barviv pH diferenciální metodou

3.3.3.1 Příprava pufrů

Roztok KCl o koncentraci $0,025 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, pH= 1,0

Bylo naváženo 1,86 g KCl a poté rozpuštěno v 980 ml destilované vody. U takto připraveného roztoku bylo upraveno pH, aby jeho hodnota byla 1,0 a to pomocí HCl. Objem byl následně doplněn destilovanou vodou po rysku.

Roztok CH_3COONa o koncentraci $0,4 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, pH= 4,5

Bylo naváženo 54,43 g CH_3COONa a poté rozpuštěno v 960 ml destilované vody. U takto připraveného roztoku bylo upraveno pH, aby jeho hodnota byla 4,5 a to pomocí CH_3COOH . Objem byl následně doplněn destilovanou vodou po rysku.

3.3.3.2 Příprava vzorků

Pro každý vzorek bylo nachystáno šest zkumavek a do každé z nich bylo napipetováno 2,5 ml zředěného extraktu. U extraktů, kdy bylo jako rozpouštědlo použita destilovaná voda, stačilo zředit 10x a u ostatních extraktů bylo zapotřebí ředit 25x. Do tří zkumavek se vzorky bylo napipetováno 2,5 ml chloridového pufru o pH 4,5 a do zbylých tří bylo odměřeno 2,5 ml acetátového pufru o pH 1,0. Vzniklé směsi byly promíchány na vertexu a poté hned proměřeny na spektrofotometru (obr. 10) při vlnových délkách 510 a 700 nm. Jako blank byla použita destilovaná voda.



Obr. 10: Spektrofotometr

3.3.3.3 Výpočet

Celková absorbance se vypočítá z naměřených absorbancí podle vzorce:

$$A = (A_{510nm} - A_{700nm})_{pH1} - (A_{510nm} - A_{700nm})_{pH4,5} \quad (1)$$

Koncentrace monomerního pigmentu kyanidin-3-galaktosidu (c_{MP}), který je majoritním anthokyanem aronie:

$$c_{MP} = \frac{A \cdot M_r \cdot F \cdot 1000}{\varepsilon \cdot l} \quad [\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}] \quad (2)$$

A absorbance

M_r relativní molekulová hmotnost [$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$]

F faktor zředění

ε molární absorpční koeficient [$\text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$]

l tloušťka květy [cm]

Přepočet na 100 g plodů:

$$c = \frac{V \cdot 0,1 \cdot c_{MP}}{m} \quad [\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}] \quad (3)$$

V objem šťávy [ml]

m navážka [g]

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

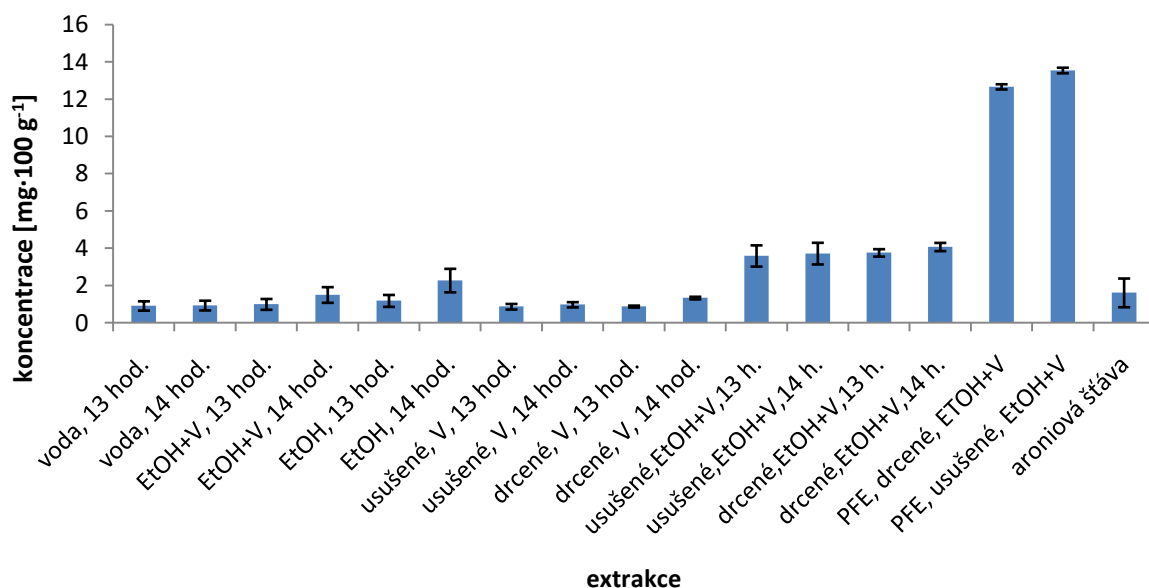
U šestnácti vzorků extrahovaných za různých podmínek bylo zkoumáno množství anthokyanových barviv, obsah polyfenolických sloučenin a sacharidů. Sedmnáctý vzorek je aroniová šťáva, k jejíž hodnotě se vztahuje množství jednotlivých sloučenin vyextrahovaných různým způsobem.

4.1 Stanovení anthokyanů pH diferenciální metodou

Vzorky pro stanovení celkových anthokyanů byly připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.3.2, výpočet je popsán v kapitole 3.3.3.3. Následující tabulka uvádí nalezené hodnoty anthokyanových barviv v jednotlivých extraktech a v aroniové šťávě. Při kvantifikaci byla použita molekulová hmotnost majoritního anthokyanu, kterým je pro aronii kyanidin-3-galaktosid.

Tab. 3: Vliv extrakčních podmínek na koncentraci anthokyanů

Vzorek	Extrakce	Průměrná koncentrace anthokyanů [mg·100 g ⁻¹]
1.	voda, 13 hod.	0,91±0,25
2.	voda, 14 hod.	0,93±0,26
3.	EtOH+V, 13 hod.	1,00±0,29
4.	EtOH+V, 14 hod.	1,50±0,42
5.	EtOH, 13 hod.	1,18±0,32
6.	EtOH, 14 hod.	2,27±0,63
7.	usušené, V, 13 hod.	0,87±0,15
8.	usušené, V, 14 hod.	0,97±0,14
9.	drcené, V, 13 hod.	0,88±0,05
10.	drcené, V, 14 hod.	1,33±0,07
11.	usušené, EtOH+V, 13 h.	3,59±0,57
12.	usušené, EtOH+V, 14 h.	3,72±0,58
13.	drcené, EtOH+V, 13 h.	3,76±0,20
14.	drcené, EtOH+V, 14 h.	4,07±0,22
15.	PFE, drcené, EtOH+V	12,66±0,14
16.	PFE, usušené, EtOH+V	13,54±0,15
17.	aroniová šťáva	1,61±0,77



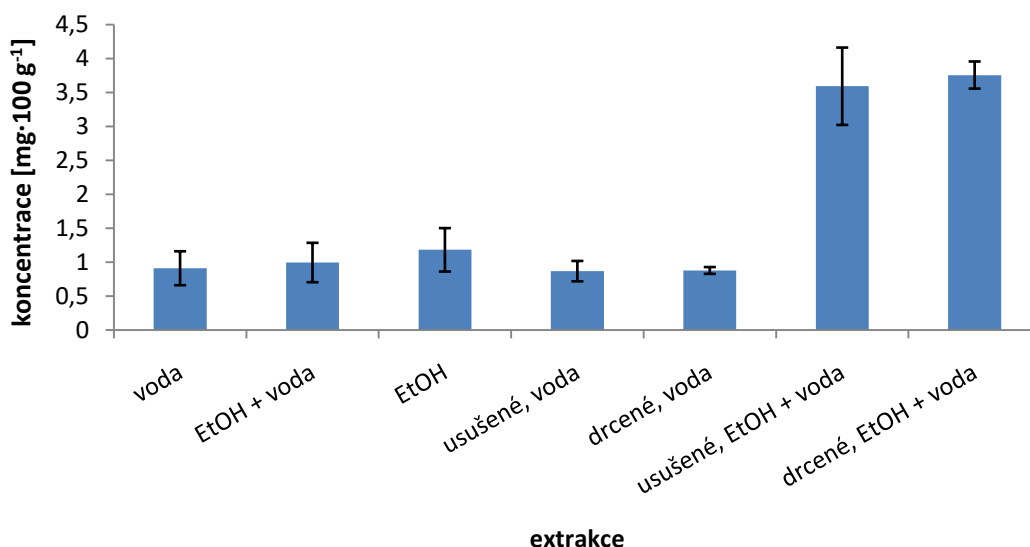
Obr. 11: Vliv extrakčních podmínek na koncentraci anthokyanů stanovených pH diferenciální metodou

Z tabulky 3 a z obr. 11 je patrné, že na získání anthokyanových barviv z výlisků měla největší efekt PFE extrakce za použití kombinace ethanolu a destilované vody jako rozpouštědla, teploty 80 °C a tlaku 15 MPa (vzorky č. 15 a 16). Výťažnost byla až 15x vyšší než při extrakci samotnou vodou.

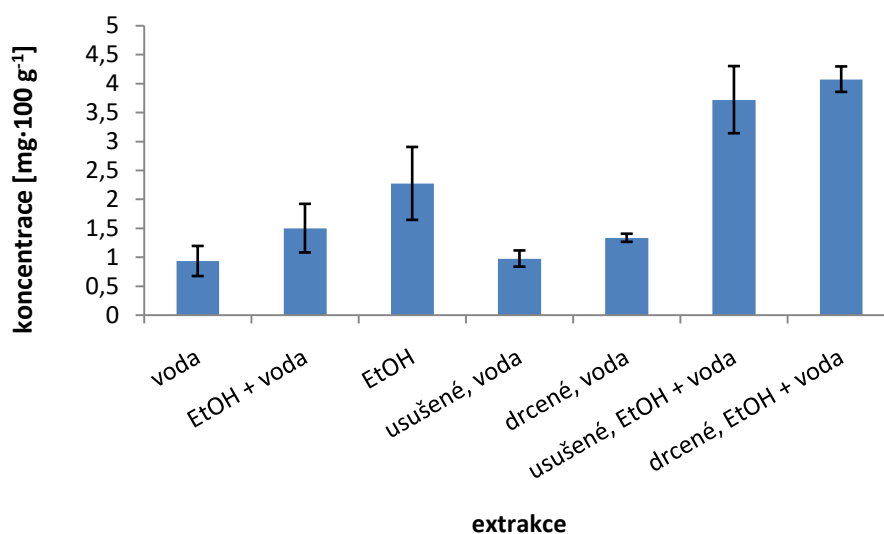
Zvýšená teplota má za následek vyšší těkavost látek, což vede k lepší rozpustnosti v daném rozpouštědle. [31, 32] Navas a kol. ve své studii extrakce anthokyanů zdůrazňují, že množství extrahovaného pigmentu je závislé na vyšší teplotě při extrakci. [31]

Porovnáním usušených ($13,54 \pm 0,15 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) a drcených ($12,66 \pm 0,14 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) výlisků, extrahovaných touto technikou, vyšly lépe co do obsahu anthokyanů „jen“ ty usušené. Nicméně rozdíl byl jen jeden gram.

Pominu-li PFE extrakci, tak v samotné aroniové šťávě bylo 6. největší množství anthokyanů ($1,61 \pm 0,77 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$). Důvodem může být, že dužina plodu aronie je světle žlutá, není tmavě modrá jako slupka. A při lisování se ze slupky do šťávy uvolní jen určitá část barviva. I Kapci a kol. ve své analýze, kde porovnávali mimo jiné i aroniovou šťávu s výlisky, stanovili, že největší obsah anthokyanů byl právě v aroniových výliscích. [46]



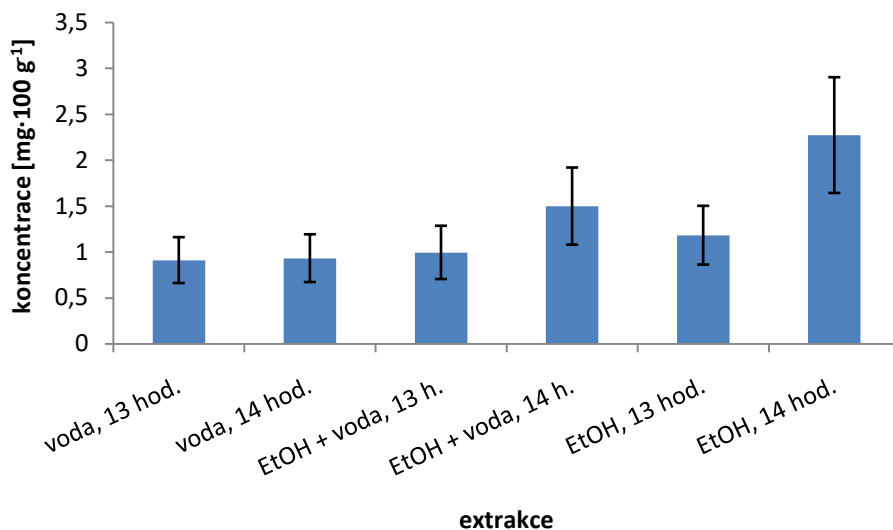
Obr. 12: Koncentrace anthokyanů ve vzorcích po 13 hod. extrakci



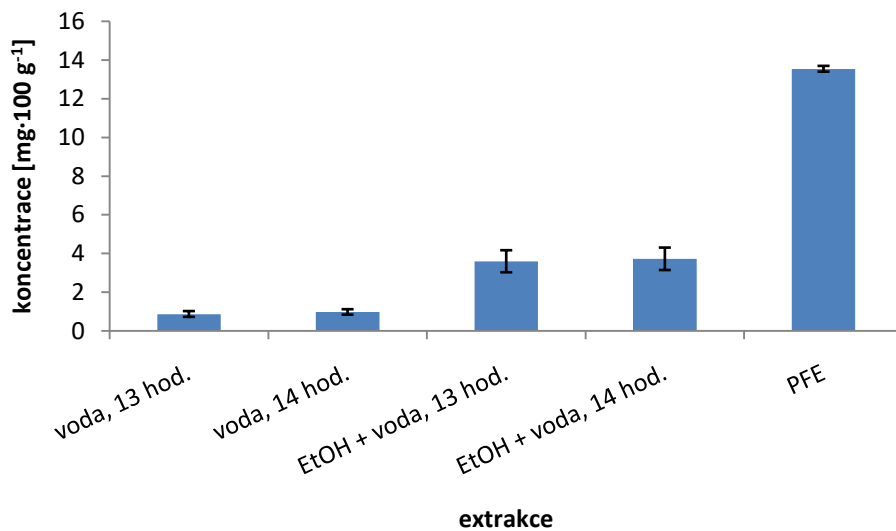
Obr. 13: Koncentrace anthokyanů ve vzorcích po 14 hod. extrakci

Největší „hodinový skok“ v rozdílu množství anthokyanů po 13 a 14 hodinách byl zaznamenán u extrakce za použití ethanolu v mražených plodech ($1,18 \pm 0,32 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ a $2,27 \pm 0,63 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$). Jednalo se skoro o dvojnásobek. Druhý největší hodinový nárůst byl zaznamenán také u mražených plodů s využitím kombinace opět ethanolu a destilované vody. Nicméně použití ethanolu jako samotného rozpouštědla je ekonomicky náročné.

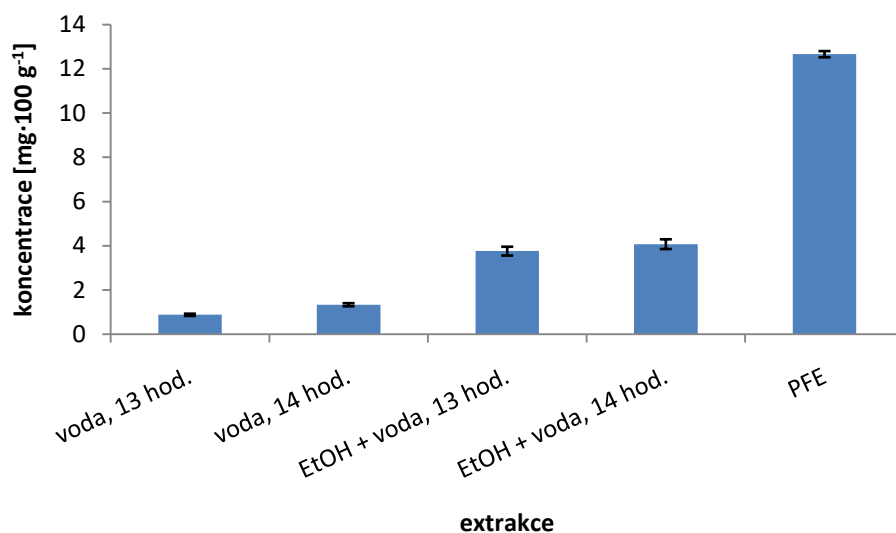
Nejmenší hodinový rozdíl v extrakci byl za použití destilované vody u mražených plodů ($0,91 \pm 0,25 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ a $0,93 \pm 0,26 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$). V tomto případě šlo o rozdíl pouhých dvou desetín miligramu.



Obr. 14: Koncentrace anthokyanů v mražených vyliscích



Obr. 15: Koncentrace anthokyanů v usušených vyliscích



Obr. 16: *Koncentrace anthokyanů v drcených výliscích*

Pokud bychom se chtěli obejít bez využití PFE extrakce, pak důležitou roli v získání co největšího množství anthokyanových barviv, hrálo usušení, popř. i následné podrcení výlisků. Samotná destilovaná voda se jako rozpouštědlo v tomto případě vůbec neosvědčila. Nejhůře se anthokyan extrahovaly do vody z usušených výlisků. Voda je sice levné rozpouštědlo, šetrné k životnímu prostředí, nicméně extrakční účinnost tím spíš při pokojové teplotě je velice nízká. Ke stejnému závěru ve své studii došli i Navas a kol. [31]

4.2 Stanovení polyfenolických sloučenin metodou HPLC

Vzorky pro stanovení polyfenolických sloučenin byly analyzovány podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.1.

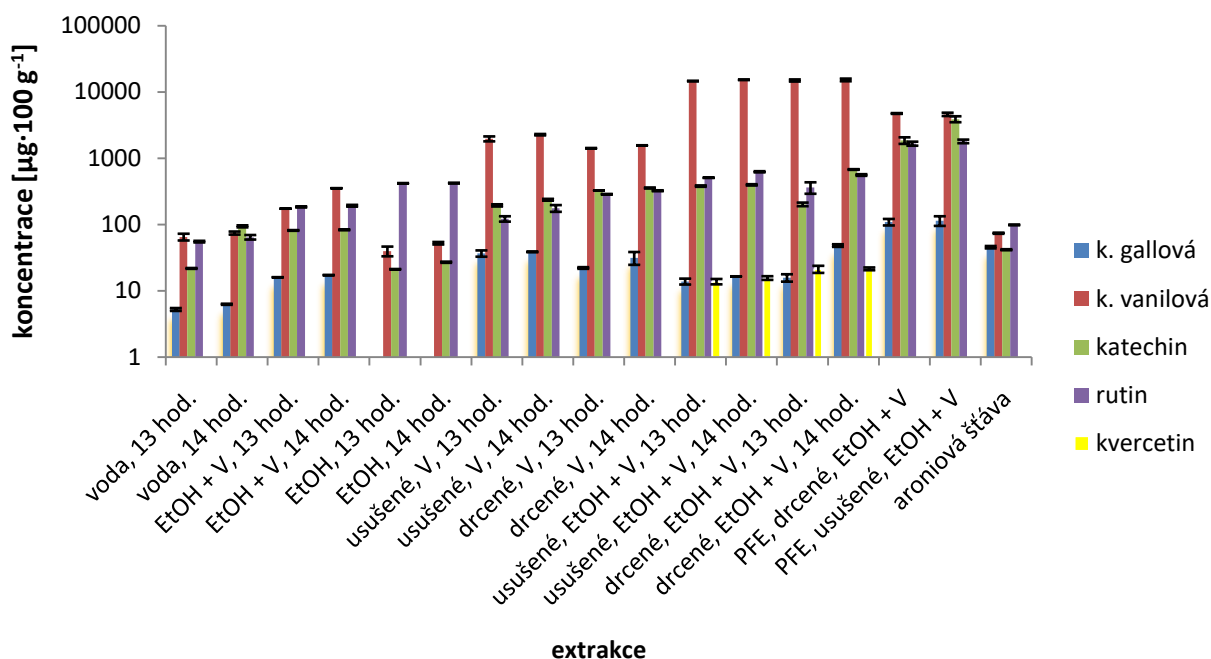
Následující tabulka uvádí nalezené hodnoty sledovaných polyfenolických sloučenin v jednotlivých extraktech a v aroniové šťávě. Ve vzorcích byly sledovány obsahy kyseliny gallové, vanilové, kumarové, ferulové, katechinu, rutinu a kvercetin. Rutin s kvercetinem byly detekovány při 350 nm, kyseliny ferulová a kumarová při 330 nm a zbylé složky (katechin a kyseliny gallová a vanilová) při 280 nm. Porovnání všech vzorků je vidět na obr. 17. Kyseliny ferulová a kumarová ani v jednom ze vzorků detekovány nebyly.

Tab. 4: Vliv extrakčních podmínek na obsah polyfenolů

Vzorek	Extrakce	Průměrná koncentrace [$\mu\text{g}\cdot 100\text{ g}^{-1}$]					Σ polyfenolů [$\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$]
		k. gallová	k. vanilová	katechin	rutin	kvercetin	
1.	voda, 13 h.	5,23±0,26	64,97±7,59	21,74±0,31	55,19±1,54	nedetekován	0,15±0,01
2.	voda, 14 h.	6,26±0,12	74,37±3,94	93,85±3,32	64,35±5,07	nedetekován	0,24±0,01
3.	EtOH+V, 13 h.	16,00±0,03	173,31±0,14	81,35±0,93	184,25±3,75	nedetekován	0,45±0,01
4.	EtOH+V, 14 h.	17,24±0,0	352,45±0,25	83,19±1,25	191,9±5,88	nedetekován	0,64±0,01
5.	EtOH, 13 h.	nedetekována	39,79±6,65	21,18±0,01	418,61±3,16	nedetekován	0,48±0,01
6.	EtOH, 14 h.	nedetekována	52,22±2,27	26,97±0,54	421,03±5,64	nedetekován	0,49±0,01
7.	usušené, V, 13 h.	36,65±3,99	1964±167,4	194,27±7,39	121,83±11,35	nedetekován	2,32±0,19
8.	usušené, V, 14 h.	38,64±0,49	2263±54,64	236,26±7,28	175,79±20,54	nedetekován	2,71±0,08
9.	drcené, V, 13 h.	22,08±0,63	1417±9,14	327,49±0,11	286,05±2,75	nedetekován	2,05±0,01
10.	drcené, V, 14 h.	31,54±6,91	1559±8,58	355,24±6,34	323±4,91	nedetekován	2,27±0,03
11.	usušené, EtOH+V, 13 h.	13,84±1,41	14590±138,4	379,56±9,07	506,63±2,98	13,79±1,28	15,50±0,15
12.	usušené, EtOH+V, 14 h.	16,52±0,02	15201±111,2	396,4±8,85	624,3±12,6	15,6±0,99	16,25±0,13
13.	drcené, EtOH+V, 13 h.	15,75±2,01	14884±545,4	201,46±12,43	362±71,13	21,22±2,60	15,48±0,63
14.	drcené, EtOH+V, 14 h.	48,17±2,18	15179±698,2	675,41±7,84	558,15±15,76	21,46±1,04	16,48±0,73

Tab. 4: Pokračování

15.	PFE, drcené, EtOH+V	108,99±12,2	4726,8±63,3	1855±210,4	1660,03±115,3	nedetekován	8,35±0,40
16.	PFE, usušené, EtOH+V	114,18±18,9	4594,7±264,7	3890±399,8	1795,7±111	nedetekován	10,39±0,80
17.	aroniová šťáva	45,50±1,87	73,83±1,43	41,63±0,71	98,53±1,23	nedetekován	0,26±0,01



Obr. 17: Vliv extrakčních podmínek na obsah polyfenolů

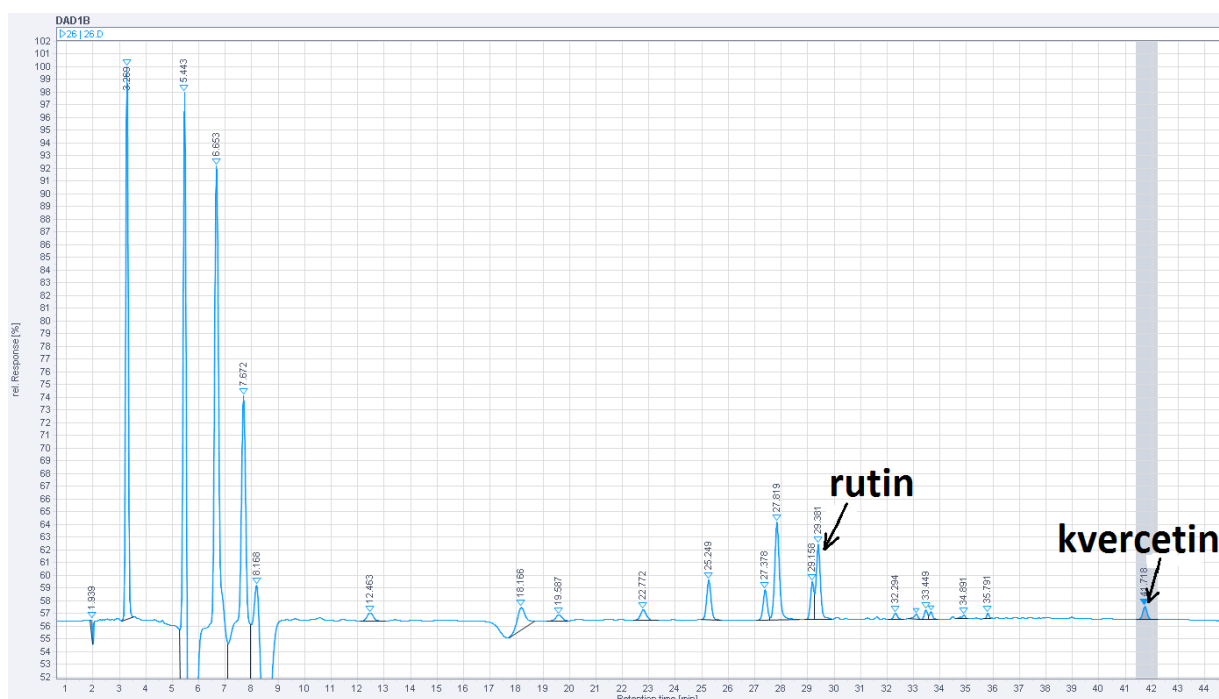
Nejvyšší obsah kyseliny gallové byl v usušených výliscích ($114,18 \pm 18,9 \mu\text{g} \cdot 100 \text{g}^{-1}$) extrahovaných za vysoké teploty a tlaku, nejnižší naopak ve výliscích extrahovaných do vody po 13 hodinách ($5,23 \pm 0,26 \mu\text{g} \cdot 100 \text{g}^{-1}$). Ve vzorcích č. 5 a 6 kyselina gallová vůbec detekována nebyla, jako rozpouštědlo byl použit samotný ethanol. Pominu-li PFE extrakci, tak i do usušených a drcených výlisků, kdy bylo jako rozpouštědlo použita samotná destilovaná voda, se kyselina gallová extrahovala velice dobře.

Kyselina vanilová se nejlépe extrahovala z usušených výlisků za použití ethanolu a vody po 14 hodinách ($15201 \pm 111,2 \mu\text{g} \cdot 100 \text{g}^{-1}$). Celkově je množství této kyseliny extrahovaných z usušených/drcených výlisků až trojnásobně vyšší než za použití vysokotlaké extrakce. Rozdíl v obsahu kyseliny vanilové mezi výše zmíněnými extrakčními podmínkami a použitím samotného ethanolu u mražených výlisků je propastný (až 382x nižší). Je zřejmé, že usušení mělo na obsah kyseliny vanilové velký vliv, ať už bylo použito jakékoliv rozpouštědlo. Je zajímavé, že v případě stanovení této kyseliny neměla PFE extrakce až takový efekt. Její množství vyextrahované za těchto podmínek bylo trojnásobně nižší.

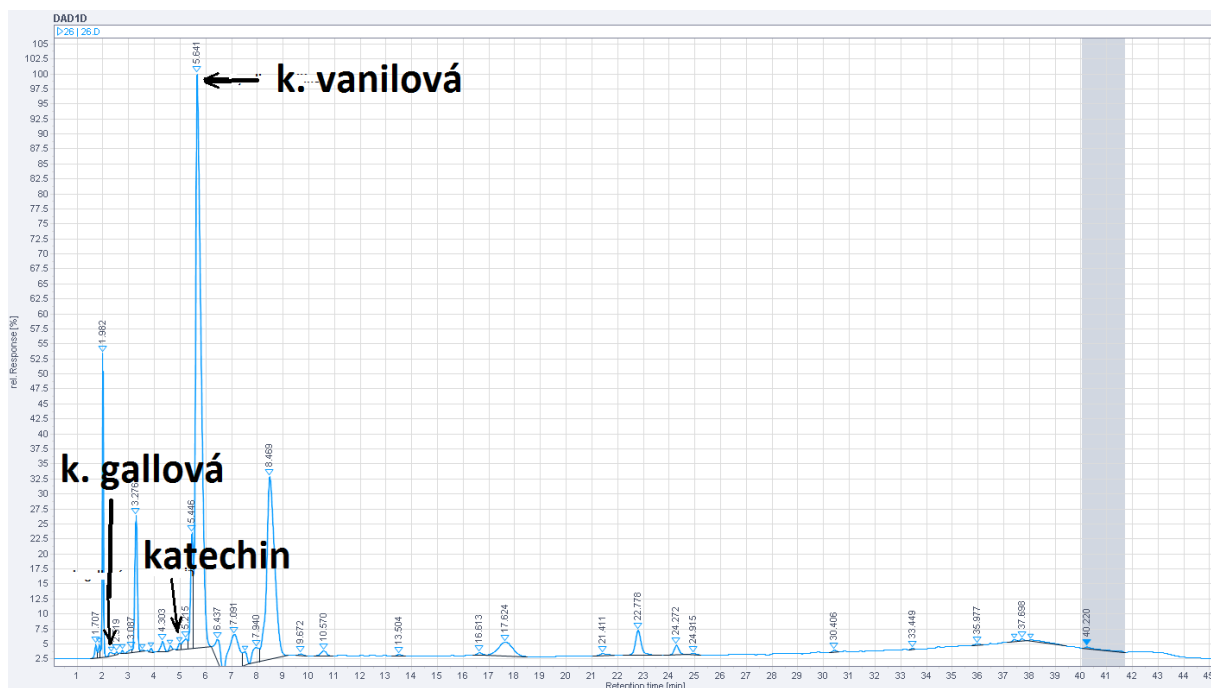
Pro extrakci katechinu se naopak PFE extrakce osvědčila ($3890 \pm 399,8 \mu\text{g} \cdot 100 \text{g}^{-1}$). Rozdíl u drcených výlisků za použití PFE je až 6x vyšší než u extrakce s kombinací ethanolu a vody jako rozpouštědla. Nejméně katechinu se stejně jako u dvou předchozích sloučenin extrahovalo z mražených výlisků do ethanolu ($21,18 \pm 0,01 \mu\text{g} \cdot 100 \text{g}^{-1}$).

Kvercetin se objevil jen ve čtyřech vzorcích, a to v usušených a drcených výliscích extrahovaných do ethanolu s vodou (vzorky č. 11 až 14). Kvercetin je aglykon rutinu a při sušení výlisků mohlo dojít k odštěpení sacharidové složky. Sójka a kol. ve své analýze zmiňují to stejné. [2] Jednalo se ale jen o výlisky extrahované do ethanolu a vody. Za využití samotné destilované vody u usušených ani u drcených výlisků kvercetin v mých vzorcích detekován nebyl. V porovnání usušených a drcených výlisků, dopadly lépe drcené.

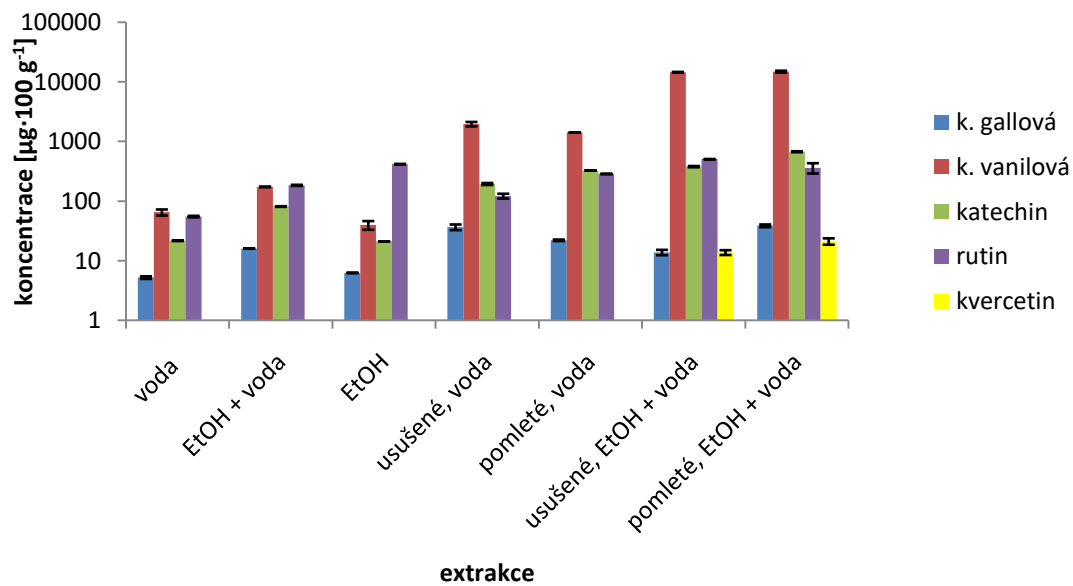
U rutinu se opět osvědčila PFE extrakce- lépe u usušených výlisků na úkor drcených ($1660,03 \pm 115,3 \mu\text{g} \cdot 100 \text{g}^{-1}$). Oproti této technice bylo do vody extrahováno zanedbatelné množství rutinu ($55,19 \pm 1,54 \mu\text{g} \cdot 100 \text{g}^{-1}$).



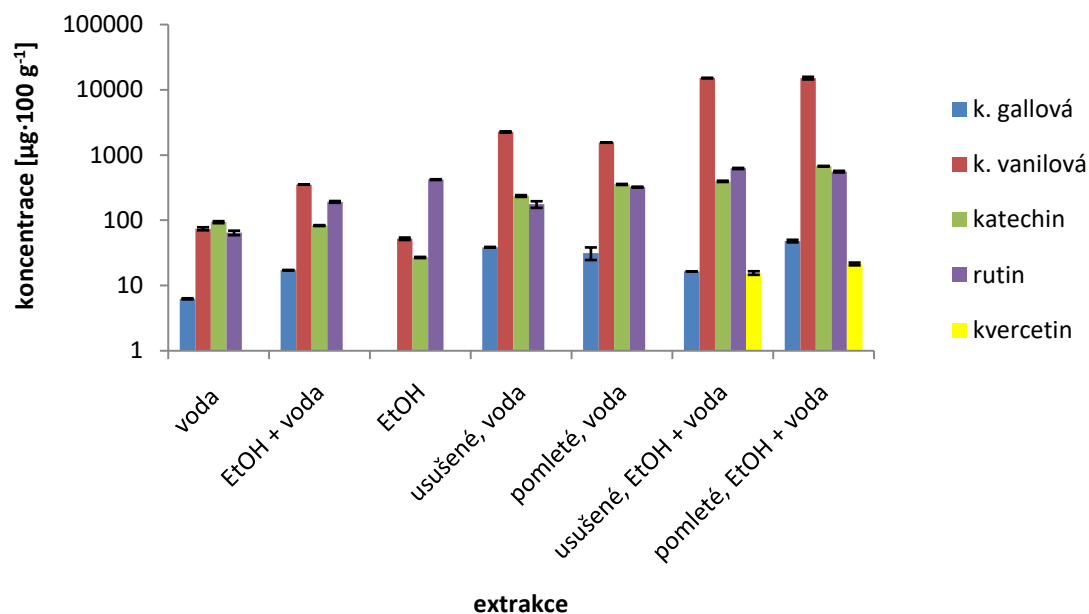
Obr. 18: Chromatogram pomletých výlisků extrahovaných do ethanolu a vody po 14 hodinách (detekovaných při 350 nm)



Obr. 19: Chromatogram pomletých výlisků extrahovaných do ethanolu a vody po 14 hodinách (detekovaných při 280 nm)



Obr. 20: Obsah polyfenolů ve vzorcích po 13 hod. extrakci



Obr. 21: Obsah polyfenolů ve vzorcích po 14 hod. extrakci

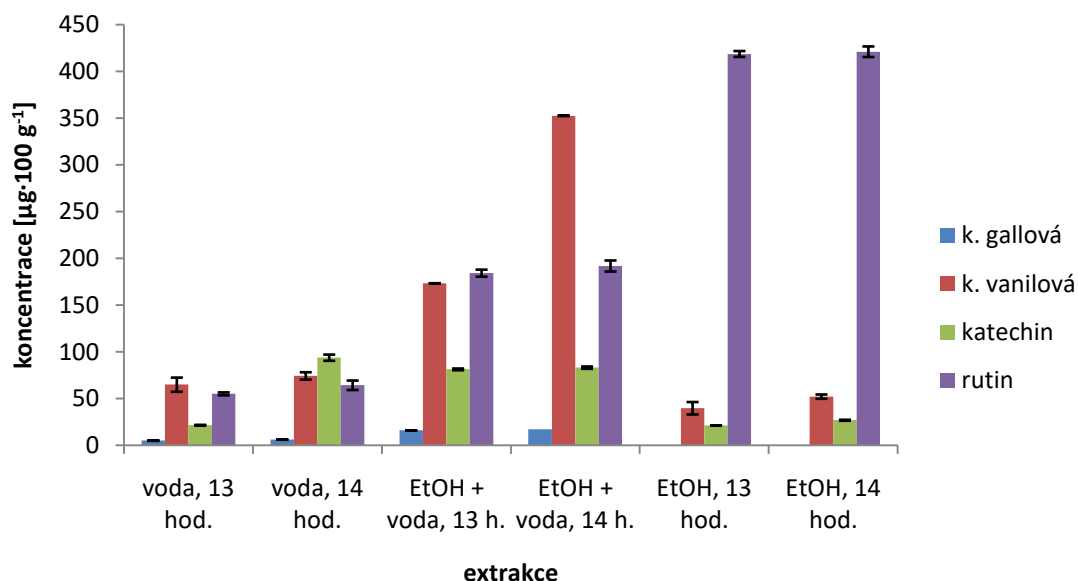
Největší hodinový nárůst v obsahu kyseliny gallové byl u drcených výlisků extrahovaných do ethanolu a vody. Rozdíl mezi 13 a 14 hodinovou extrakcí byl více než 32 µg. Nejmenší pak u extrakce do samotné destilované vody- jednalo se o rozdíl pouhého 1 µg.

U kyseliny vanilové byl největší nárůst u usušených výlisků extrahovaných do ethanolu a vody. Jednalo se o rozdíl více než 600 µg. Nejmenší změna pak byla u extrakce mražených výlisků do destilované vody- méně než 10 µg.

V případě katechinu byl největší hodinový rozdíl u drcených výlisků extrahovaných do ethanolu a vody- více než 470 µg. Nejméně se změnil obsah katechinu u extrakce do ethanolu- necelých 6 µg.

Největší hodinový nárůst u rutinu byl u drcených výlisků za použití kombinace ethanolu a vody. Rozdíl v tomto případě byl 196 µg. Nejméně se po hodině lišil obsah rutinu extrahovaného do ethanolu- rozdíl pouhé 2 µg.

U kvercetinů detekovaného pouze u čtyř vzorků, byl rozdíl vyšší u usušených výlisků než v drcených.



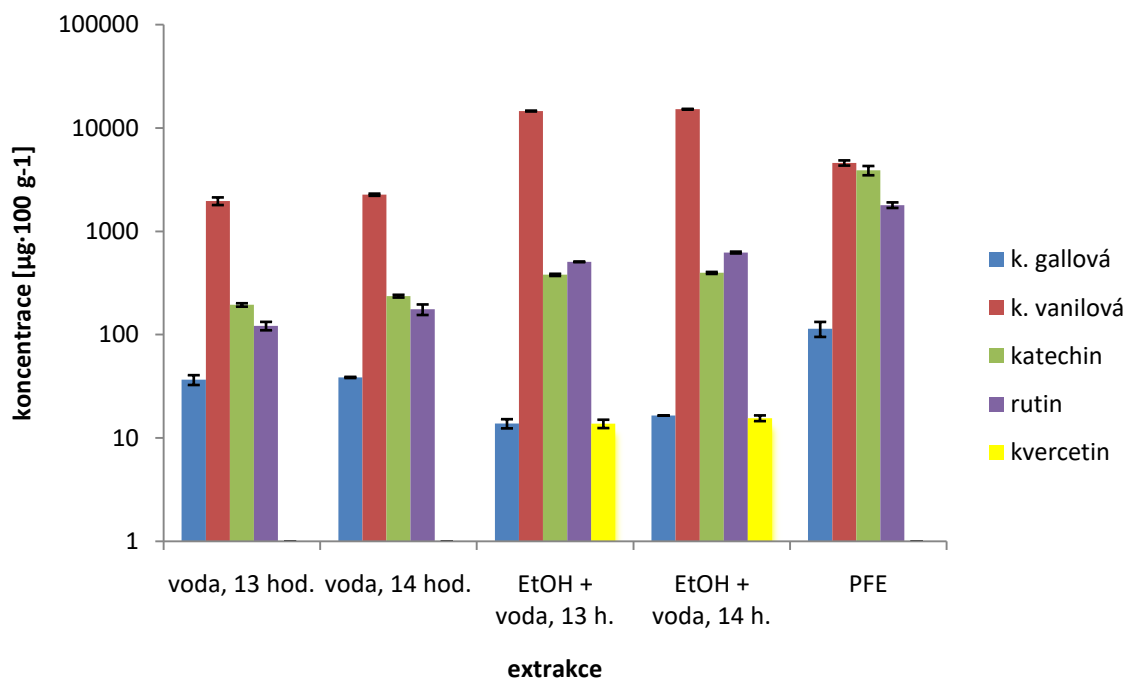
Obr. 22: Obsah polyfenolů v mražených výliscích

Kyselina gallová se nejlépe extrahovala z usušených výlisků, a to i případě PFE extrakce. U mražených výlisků se jako nejlepší rozpouštědlo osvědčila kombinace ethanolu a vody. U usušených výlisků dopadla lépe voda, neberu-li v potaz PFE extrakci.

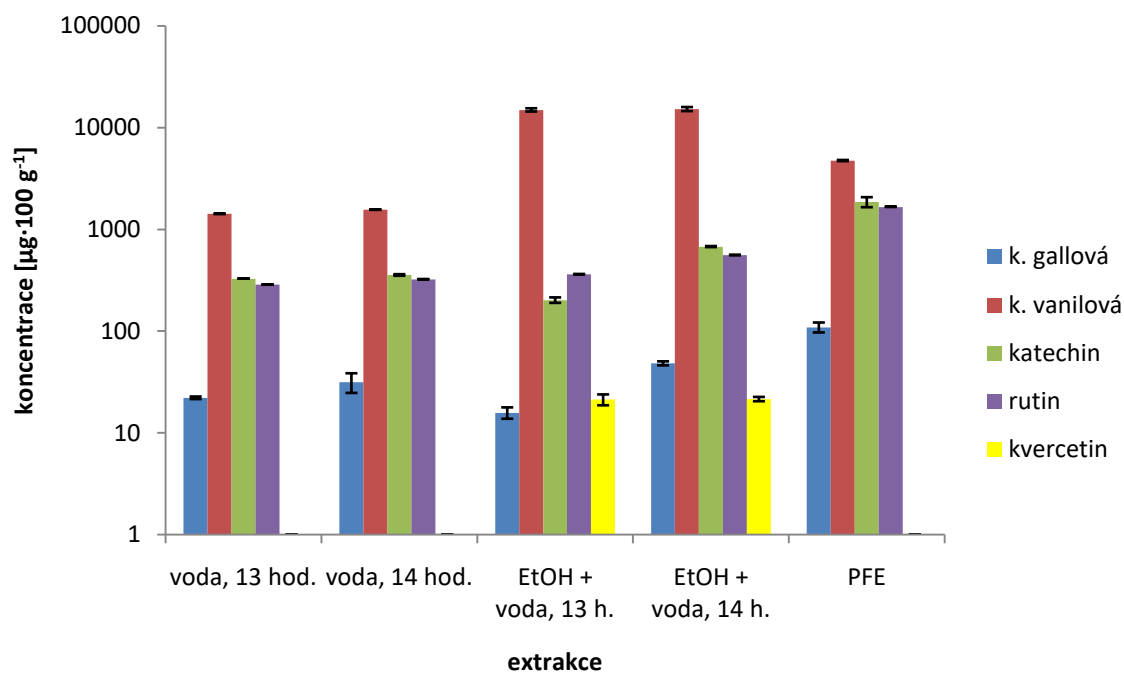
U kyseliny vanilové se také jednalo o vyšší výtěžnost z usušených výlisků, nejhůře v tomto případě dopadly mražené výlisky. Nejlépe dopadla kombinace ethanolu a destilované vody. Dokonce i extrakce do destilované vody u usušených/drcených výlisků (vzorky č. 7 až 10) dopadla lépe než u mražených výlisků za použití kombinovaného rozpouštědla.

I u katechinu se opět potvrdila důležitost sušení plodů především v případě PFE extrakce. Rozdíl v množství katechinu mezi mraženými a usušenými plody je 173 až 654 µg.

V mražených výliscích se u předchozích sloučenin (kyseliny gallová a vanilová a katechin) nikdy ethanol jako rozpouštědlo neosvědčil, v případě rutinu byla ale výtěžnost nejvyšší. Usušené versus drcené výlisky extrahované do ethanolu a vody dopadly velmi podobně.



Obr. 23: Obsah polyfenolů v usušených výliscích



Obr. 24: Obsah polyfenolů v pomletých výliscích

Při porovnání obr. 23 a 24 (grafů usušených a drcených výlisců) je vidno, že rozdíly v obsahu jednotlivých složek nejsou tak velké jako na obr. 22 v mražených výliscích, zvláště u extrakce ethanolom.

Nejvyšší výtěžnosti polyfenolů bylo dosaženo v drcených výliscích za použití kombinace ethanolu a vody po 14 hodinách extrakce s celkovým obsahem polyfenolů

16,48 mg·100 g⁻¹. Největší měrou k tomu přispělo množství kyseliny vanilové, která se obecně nejlépe extrahovala z usušených a/nebo drcených výlisků do ethanolu a vody. Jako nejméně efektivní extrakce se jeví samotná destilovaná voda použita jako rozpouštědlo.

Ze všech výsledků tedy nejlépe vychází extrakce usušených a drcených výlisků za použití ethanolu a vody nejenom kvůli tomu, že pouze v těchto vzorcích byl detekován i kvercetin. Ke stejnému závěru došli i Kapci a kol., kteří též stanovili, že největší obsah polyfenolických sloučenin bylo v usušených výliscích. [46]

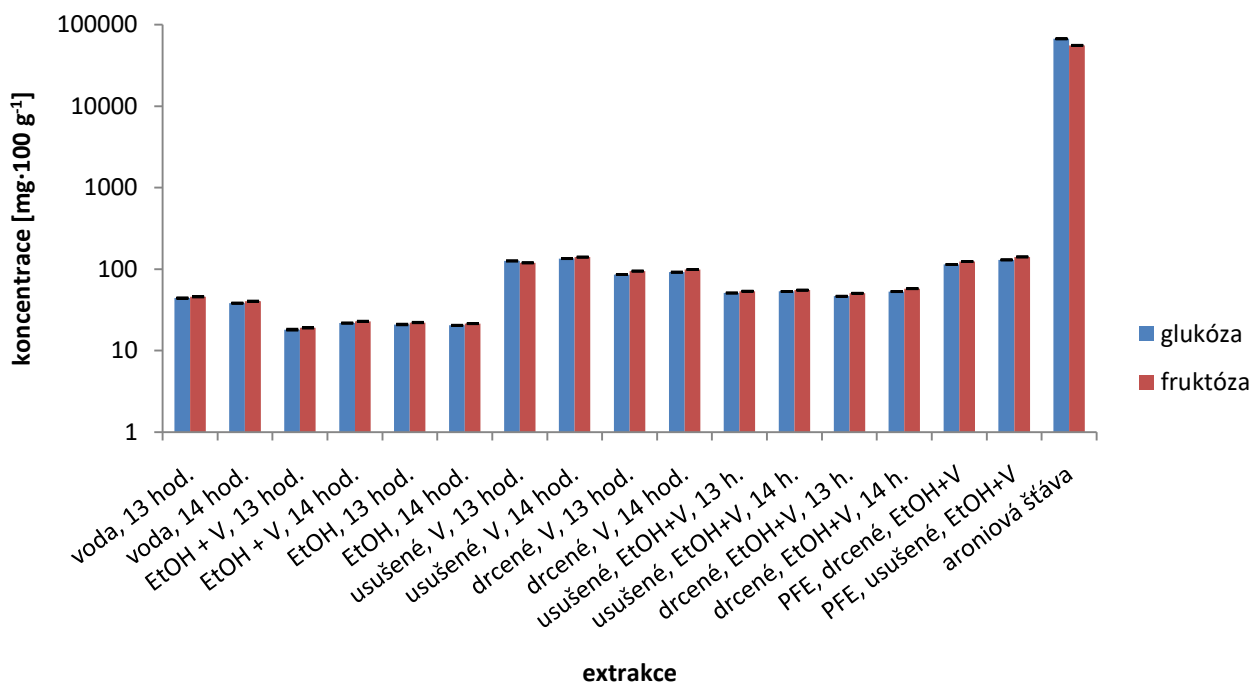
V aroniové šťávě bylo detekováno nejvíce rutinu a nejméně katechinu, nicméně rozdíly v obsahu jednotlivých složek nebyly velké- pouze v rozmezí desítek µg.

4.3 Stanovení sacharidů metodou HPLC

Vzorky pro stanovení polyfenolických sloučenin byly analyzovány podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.2. Následující tabulka uvádí nalezené hodnoty sledovaných sacharidů v jednotlivých extraktech a v aroniové šťávě. Sacharóza v mých vzorcích detekována nebyla, zato na každém chromatogramu u všech vzorků je patrný dominantní pík, eluovaný mezi fruktózou a glukózou. S největší pravděpodobností se jedná o sorbitol, který ale nebylo možné ověřit.

Tab. 5: Vliv extrakčních podmínek na obsah sacharidů

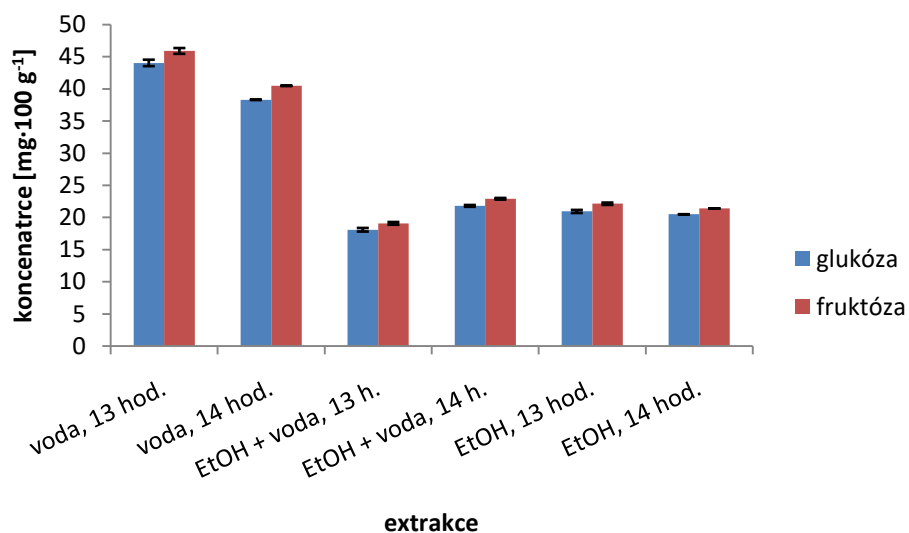
Vzorek	Extrakce	Průměrná koncentrace sacharidu [$\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$]	
		glukóza	fruktóza
1.	voda, 13 hod.	38,30±0,01	40,48±0,04
2.	voda, 14 hod.	44,04±0,50	45,91±0,45
3.	EtOH+V, 13 hod.	18,10±0,28	19,10±0,21
4.	EtOH+V, 14 hod.	21,81±0,14	22,92±0,13
5.	EtOH, 13 hod.	20,50±0,01	21,40±0,01
6.	EtOH, 14 hod.	20,94±0,24	22,14±0,18
7.	usušené, V, 13 hod.	126,04±0,01	119,38±0,05
8.	usušené, V, 14 hod.	134,42±0,14	140,60±0,11
9.	drcené, V, 13 hod.	85,92±0,13	94,71±0,15
10.	drcené, V, 14 hod.	91,94±0,19	98,93±0,21
11.	usušené, EtOH+V, 13 hod.	50,94±0,23	53,60±0,23
12.	usušené, EtOH+V, 14 hod.	53,25±0,15	55,31±0,19
13.	drcené, EtOH+V, 13 hod.	46,54±0,10	50,63±0,09
14.	drcené, EtOH+V, 14 hod.	53,15±0,28	57,72±0,32
15.	PFE, drcené, EtOH+V	114,02±0,07	123,69±0,05
16.	PFE, usušené, EtOH+V	129,81±0,18	141,25±0,17
17.	aroniová šťáva	66924±82,44	55798±21,03



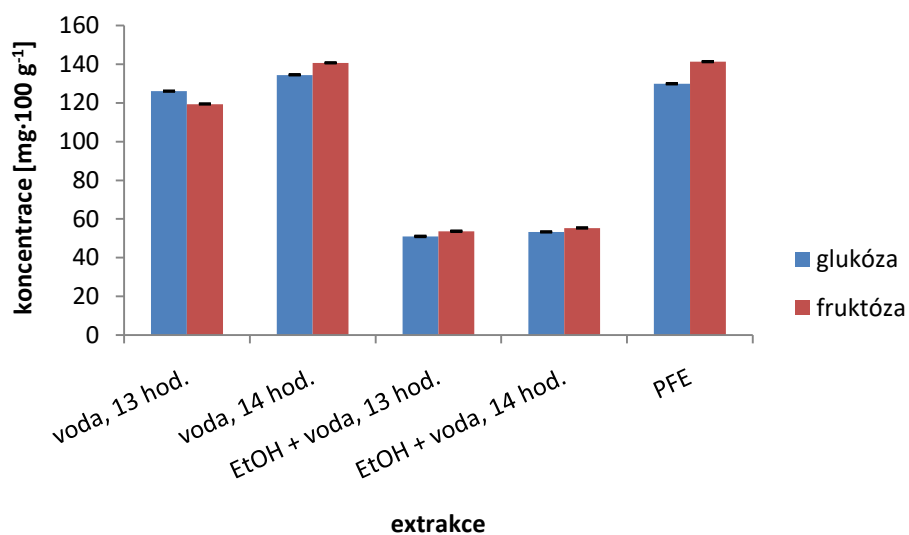
Obr. 25: Vliv extrakčních podmínek na obsah sacharidů

U každého vzorku kromě aroniové šťávy je patrné, že množství fruktózy je o něco málo větší než obsah glukózy. I ve studii Sójky a kol., ve které se zabývali vlivem velikosti částic usušených výlisků na obsah různých složek, jim u některých vzorků vyšel větší obsah fruktózy než glukózy. [2]

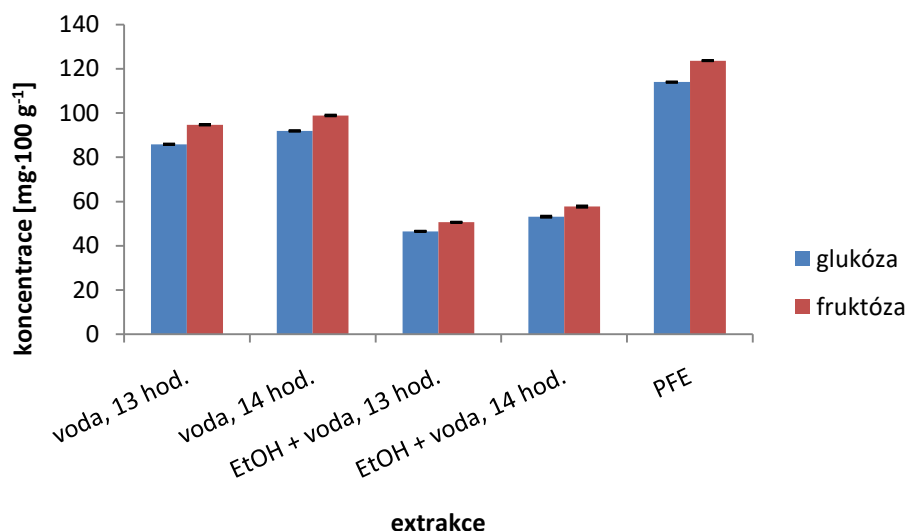
V porovnání obsahu sacharidů nejlépe dopadla aroniová šťáva ($66924 \pm 82,44 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$). Obsahovala až 3600x více glukózy než u mražených výlisků extrahovaných do ethanolu a vody ($18,10 \pm 0,28 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$). V průměru se z aroniových výlisků vyextrahovalo $65,61 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ glukózy a $69,24 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$.



Obr. 26: Obsah sacharidů v mražených vyliscích

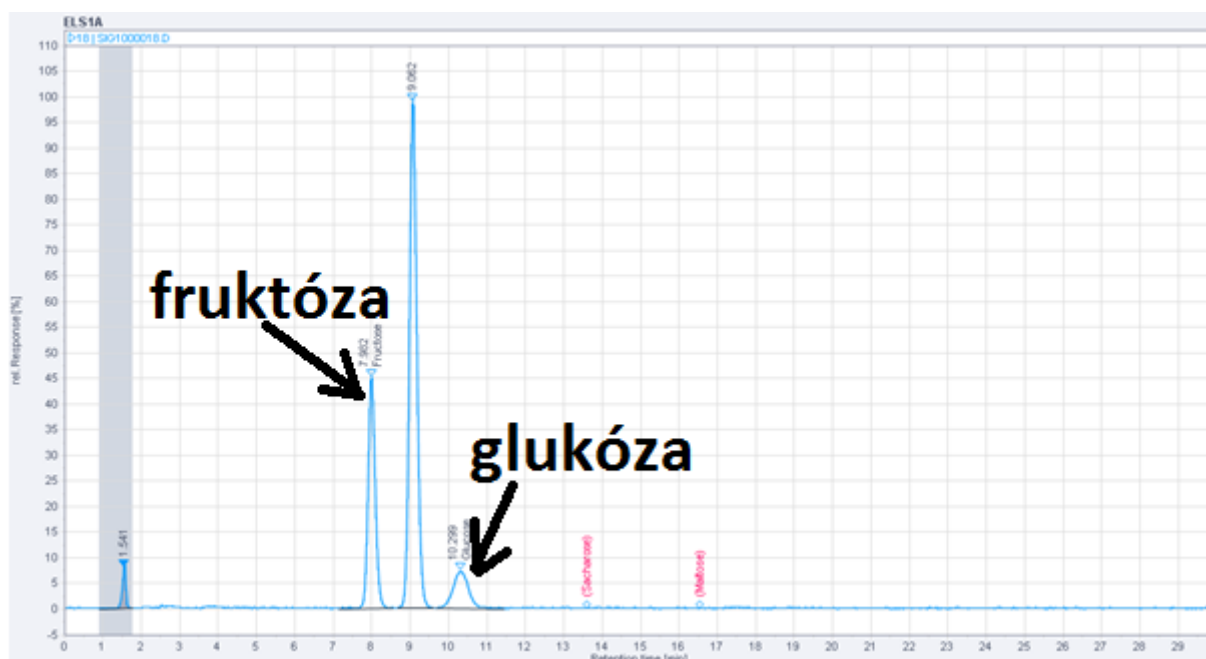


Obr. 27: Obsah sacharidů v usušených vyliscích



Obr. 28: Obsah sacharidů v drcených výliscích

U mražených výlisků zafungovala jako nejlepší rozpouštědlo voda ($44,04 \pm 0,50$ $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ glukózy a $45,91 \pm 0,45$ $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$). Hodnoty sacharidů extrahovaných do samotného ethanolu nebo do ethanolu s vodou byly v případě mražených výlisků skoro stejné. V porovnání s extrakcí anthokyanů a polyfenolů, kdy se voda jako rozpouštědlo neosvědčila, u sacharidů by se dala použít. Výtěžnost byla dokonce větší i v porovnání s PFE extrakcí u usušených plodů. Nejhůře se sacharidy extrahovaly do ethanolu a vody z mražených výlisků ($18,10 \pm 0,28$ $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ glukózy a $19,10 \pm 0,21$ $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ fruktózy).



Obr. 29: Chromatogram pomletých výlisků s využitím PFE extrakce

5. ZÁVĚR

V úvodní, teoretické části této diplomové práce jsou shrnuty potřebné výchozí informace pro zadanou studii. Je zde uvedena botanická charakteristika aronie (*Aronia melanocarpa*) stejně jako chemické složení jejích plodů a jejich využití. Detailněji jsou popsány nejdůležitější biologicky aktivní látky aronie, tj. fenolické látky a mezi nimi anthokyanová barviva. Dále je pozornost věnována kapalinové chromatografii, která byla nejdůležitější analytickou instrumentální technikou diplomové práce. Obecný popis HPLC je doplněn rešerší stanovení anthokyanových barviv kapalinovou chromatografií.

Tato diplomová práce je součástí studie zahájené v předchozím roce, na jejíž některé výsledky navazuje. [47] Experimentální část sleduje vliv vybraných extrakčních podmínek na množství vyextrahovaných fenolických látek a anthokyanových barviv z aroniových výlisků. Extrakci byly podrobeny aroniové výlisky mražené, sušené za teplot do 45 °C a usušené a ještě podrcené. Jako rozpouštědla byla vybrána destilovaná voda, ethanol a směs ethanolu a vody v poměru 1 : 1. Byla také využita extrakce za zvýšeného tlaku a teploty. V extraktech byly stanovovány monosacharidy glukóza a fruktóza, 5 vybraných fenolických sloučenin (kyseliny gallová, vanilová, katechin, rutin a kvercetin) a celkový obsah anthokyanových barviv. Pro porovnání stanovených hodnot byla k dispozici aroniová šťáva.

Nejvyšší obsah anthokyanových barviv byl získán, podle očekávání, extrakcí za zvýšeného tlaku a teploty (PFE). Složení extrakčního činidla, teplota a tlak byly zkoušeny na Ústavu analytické chemie AV ČR speciálně pro tato barviva. Pro průmyslovou praxi však zatím tato extrakční technika není použitelná pro velkou finanční náročnost.

Pravděpodobně využitelných výsledků bylo dosaženo extrakční směsí ethanol : voda v objemových poměrech 1 : 1. V této směsi byly po dobu 13 až 14 hod. při laboratorní teplotě macerovány drcené aroniové výlisky usušené za teploty do 45 °C. Takto získané extrakty obsahovaly 3,59 až 4,07 mg·100 g⁻¹ anthokyanových barviv.

Z aroniových výlisků byly dále získány fenolické látky. Pro jejich získání byly jednoznačně nejlepší extrakční směsí ethanol : voda v objemových poměrech 1 : 1. Vzorky pro stanovení fenolických sloučenin byly odebrány ve stejném čase jako při extrakci anthokyanů. A výtěžek extrakce fenolických látek po 13 a 14 hod. se opět lišil jen málo. V uvedeném časovém rozmezí byla nalezena suma 15,48 a 16,48 mg·100 g⁻¹ vybraných výše uvedených fenolických sloučenin.

Dále byly ve vzorcích z aroniových výlisků stanoveny glukóza a fruktóza. Nejvíce těchto monosacharidů bylo nalezeno v aroniové šťávě. Z extraktů byly na obsah monosacharidů nejbohatší ty, které byly získané metodou PFE a nebo pouze macerované po dobu 13 až 14 hod. vodou. PFE bylo extrahováno 129,8 mg·100 g⁻¹ glukózy a 141,2 mg·100 g⁻¹ fruktózy. Při extrakci sušených nedrcených výlisků vodou bylo nalezeno 134,4 mg·100 g⁻¹ glukózy a 140,6 mg·100 g⁻¹ fruktózy.

Bylo potvrzeno, že aroniové výlisky jsou dobrým zdrojem jak fenolických látek, tak především anthokyanových barviv. Obou typů uvedených sloučenin obsahují více než aroniová šťáva. Aroniové výlisky by tak v budoucnu mohly být využity k izolaci zejména anthokyanů, které jsou žádaným potravinářským barvivem.

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

1. GRUNOVAITĚ, L., PUKALSKIENĚ, M., PUKALSKAS, A., VENSKUTONIS, P. R. Fractionation of black chokeberry pomace into functional ingredients using high pressure extraction methods and evaluation of their antioxidant capacity and chemical composition. *Journal of Functional Food*, 2016, vol. 24, pp. 85-96.
2. SÓJKA, M., KOŁODZIEJCZYK, K., MILALA, J. Polyphenolic and basic chemical composition of black chokeberry industrial by-products. *Industrial Crops and Products*, 2013, vol. 51, pp. 77-86.
3. <http://www.onlyfoods.net/aronia-berry-chokeberry.html>
4. KYLE, M. Rousseau. *Method Development for the Analysis of Anthocyanins in Aronia Berries via HPLC*. Honors College, 2014, paper 176.
5. KULLING, S. E., RAWEL, H. M. Chokeberry (*Aronia melanocarpa*)- A Review on the Characteristic Components and Potential Health Effects. *Planta Medica*, 2008, vol. 74, pp. 1625-1634.
6. OCHMIAN, I., GRAJKOWSKI, J., SMOLIK, M. Comparison of Some Morphological Features, Quality and Chemical Content of Four Cultivars of Chokeberry Fruits (*Aronia melanocarpa*). *Notulac Botanicac Horti Agrobotanici*, 2012, vol. 40(1), pp. 253-260.
7. WANGENSTEEN, H., BRÄUNLICH, M., NIKOLIC, V., MALTERUD, K. E., SLIMESTAD, R., BARSETT, H. Anthocyanins, proanthocyanidins and total phenolics in four cultivars of aronia: Antioxidant and enzyme inhibitory effects. *Journal of functional foods*, 2014, vol. 7, pp. 746-752.
8. NOWAK, D., GRĄBCZEWSKA, Z., GOŚLIŃSKI, M., OBOŃSKA, K., DĄBROWSKA, A., KUBICA, J. Effect of Chokeberry Juice Consumption on Antioxidant Capacity, Lipids Profile and Endothelial Function in Healthy People: a Pilot Study. *Czech Journal of Food Science*, 2016, vol. 34, pp. 39-46.
9. DJURIC, M., BRKOVIC, D., MILOŠEVIC, D., PAVLOVIC, M., CURČIC, S. Chemical Characterisation of the Fruit of Black Chokeberry Grown on Different Types of Soil. *Revista de chimie*, 2015, vol. 66, No. 2, pp. 178-181.
10. BOLLING, B. W., TAHERI, R., PEI, R., KRANZ, S., YU, M., DUROCHER, S. N., BRAND, M. H. Harvest date affects aronia juice polyphenols, sugars, and antioxidant activity, but not anthocyanin stability. *Food Chemistry*, 2015, vol. 187, pp. 189-196.
11. BULKOVÁ, Věra. *Rostlinné potraviny*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2011. ISBN 978-80-7013-532-7.
12. PIESZKA, M., GOGOL, P., PIETRAS, M., PIESZKA M. Valuable components of dried pomaces of chokeberry, black currant, strawberry, apple and capot as a source of natural antioxidants and nutraceuticals in the animal diet. *Annals of Animal Science*, 2015, vol. 15, No. 2, pp. 475-491.

13. OSZMIAŃSKI, J., LACHOWICZ, S. Effect of the Production of Dried Fruits and Juice from Chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) on the Content and Antioxidant Activity of Bioactive Compounds. *Molecules*, 2016, vol. 21, pp. 1098.
14. ŠNEBERGROVÁ, J., ČÍŽKOVÁ, H., NERADOVÁ, E., KAPCI, B., RAJCHL, A., VOLDŘICH, M. Variability of Characteristic Component of Aronia. *Czech Journal of Food Science*, 2014, vol. 32, No. 1, pp. 25-30.
15. NAWIRSKA, A., UKLAŃSKA, C. Waste products from fruit and vegetable processing as potential sources for food enrichment in dietary fibre. *Acta Scientiarum polonium*, 2008, vol. 7(2), pp. 35-42.
16. BRÄUNLICH, Marie. *Bioactive constituents in aronia berries*. Oslo, 2013. Thesis submitted for the degree of Ph.D. University of Oslo 2013, School of pharmacy, Department of pharmaceutical chemistry.
17. VELÍŠEK, Jan, HAJŠLOVÁ, Jana. *Chemie potravin II*. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-16-9.
18. SLIMESTAD, R., TORSKANGERPOLL, K., NATELAND, H. S., JOHANNESSEN, T., GISKE N. H. Flavonoids from black chokeberries, *Aronia melanocarpa*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2005, vol. 18, pp. 61-68.
19. MATTILA, P., HELLSTRÖM, J., TÖRRÖNEN, R. Phenolic Acids in Berries, Fruits and Beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, vol. 54, pp. 7193-7199.
20. BENVENUTI, S., PELLATI, F., MELEGARI, M., BERTELLI, D. Polyphenols, Anthocyanins, Ascorbic Acid, and Radical Scavenging Activity of *Rubus*, *Ribes* and *Aronia*. *Journal of Food Science*, 2004, vol. 69, Nr. 3.
21. KAMONPATANA, K., FAILLA, M. L., KUMAR P. S., GIUSTI, M. M. Anthocyanin structure determines susceptibility to microbial degradation and bioavailability to the buccal mucosa. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2014, vol. 62, pp. 6903-6910.
22. CASTANEDA-OVANDO, A., PACHECO-HERNÁNDEZ, Ma. de L., PÁEZ-HERNÁNDEZ, Ma. E., RODRÍGUEZ, J. A., GALÁN-VIDAL, C. A. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food chemistry*, 2009, vol. 113, pp. 859-871.
23. WU, X., GU, L., PRIOR, R. L. and MCKAY. S. Characterization of Anthocyanins and Proanthocyanidins in Some Cultivars of *Ribes*, *Aronia*, and *Sambucus* and Their Antioxidant Capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, vol. 52, pp. 7846-7856.
24. TOLIĆ, M.-T., JURČEVIĆ, I. L., KRBAVČIĆ, I. P., MARKOVIĆ, K., VAHČIĆ, N. Phenolic Content, Antioxidant Capacity and Quality of Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) Products. *Food Technology and Biotechnology*, 2015, vol. 53 (2), pp. 171-179.
25. WICZKOWSKI, W., ROMASZKO, E. and PISKULA, M. K. Bioavailability of Cyanidin Glycosides from Natural Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) Juice with Dietary-Relevant

- Dose of Anthocyanins in Humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, vol. 58, pp. 12130-12136.
26. OSZMIĄŃSKI, J., WOJDYLO, A. *Aronia melanocarpa* phenolics and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology*, 2005, vol. 221(6), pp. 809-813.
 27. WALLACW, T. C., GIUSTI, M. M. Anthocyanins. *Advanced Nutrition*, 2015, vol. 6, pp. 620-622.
 28. DANDENA, A., ZUKA, L., KOSTOVA, M. Natural antioxidants in black chokeberry marc extracts depending on the reaction method. *Foodbalt*, 2014, pp. 324-326.
 29. VLACHOJANNIS, Ch., ZIMMERMANN, B. F., CHRUBASIK-HAUSMANN, S. Quantification of Anthocyanins in Elderberry and Chokeberry Dietary Supplements. *Phytotherapy Research*, 2015, vol. 29, pp. 561-565.
 30. www.aronieprozdravi.cz
 31. NAVAS, M. J., JIMÉNEZ-MORENO, A. M., BUENO, J. M. SÁEZ-PLAZA P., ASUERO, A. G. Analysis and Antioxidant Capacity of Anthocyanins Pigments. Part IV: Extraction of Anthocyanins. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2012, vol. 42, pp. 313-342.
 32. BRAZDAUSKAS, T., MONTERO, L., VENSKUTONIS, P. R., IBANEZ, E., HERRERO, M. Downstream valorization and comprehensive two-dimensional liquid chromatography- based chemical characterization of bioactives from black chokeberries (*Aronia melanocarpa*) pomace. *Journals of Chromatography A*, 2016, vol. 1468, pp. 126-135
 33. KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
 34. HOHNOVÁ, B., ŠŤAVÍKOVÁ, L., KARÁSEK, P. Determination of Anthocyanins in Red Grape Skin by Pressurised Fluid Extraction and HPLC. *Czech Journal of Food Science*, vol. 26, S39-S42.
 35. HOHNOVÁ, Barbora. *Studium přírodních látek obsažených ve vybraných bylinách a méně obvyklých druzích drobného ovoce*. Brno, 2010. Disertační práce, Vysoké učení technické, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií.
 36. NOVÁKOVÁ, Lucie a DOUŠA, Michal. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*, Praha, 2013. ISBN 978-80-260-4244-0.
 37. https://www.google.cz/search?q=HPLC&biw=1422&bih=771&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwi4obCpscHSAhXMuxQKHZgiDpcQ_AUIBigB#tbm=isch&q=kapalinov%C3%A1+chromatografie&*&imgcr=j32IrWpNI7H7LM
 38. TAHERI, R., CONNOLLY, B. A., BRAND, M. H., BOLLING, M. W. Underutilized Chokeberry (*Aronia melanocarpa*, *Aronia arbutifolia*, *Aronia prunifolia*) Accessions Are Rich Sources of Anthocyanins, Flavonoids, Hydroxycinnamic Acids, and Proanthocyanidins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2013, vol. 61, pp. 8581-8588.

39. LEE, J. E., KIM, G-S., PARK, S., KIM, Y-H., KIM, M-B., LEE, W. S., JEONG, S. W., LEE, S. J., JIN, J. S., SHIN, S. C. Determination of chokeberry (*Aronia melanocarpa*) polyphenol components using liquid chromatography- tandem mass spectrometry: Overall contribution to antioxidant activity. *Food chemistry*, 2014, vol. 146, pp. 1-5.
40. VAGIRI, M., JENSEN, M. Influence of juice processing factors on quality of black chokeberry pomace as a future resource for colour extraction. *Food Chemistry*, 2017, vol. 217, pp. 409-417.
41. ČUJIĆ, N., ŠAVIKIN, K., JANKOVIĆ, T., PLJEVLJAKUŠIĆ, D., ZDUNIĆ, G., IBRIĆ, S. Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. *Food Chemistry*, 2016, vol. 194, pp. 135-142.
42. GIUSTI, M. M., WROLSTAD, R. E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 2001, F1.2.1-F1.2.13
43. LEE, J. et al. Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*, 2005, vol. 88, no. 5, pp. 1269-1278.
44. WROLSTAD, R. E., DURST, R. W., LEE, J. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science & Technology*, 2005, vol. 16, pp. 423-428.
45. KAPITON, Ulyana. *Extrakce bioaktivních látek z výlisků aronie*. Brno, 2017. Bakalářská práce. Vysoké učení technické, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií.
46. KAPCI, B., NERADOVÁ, E., ČÍŽKOVÁ, H., VOLDŘICH, M., RAJCHL, A., CAPANOGLU, E. Investigating the antioxidant potential of chokeberry (*Aronia melanocarpa*) products. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2013.
47. LOŠKOVÁ, Tereza. *Studium extrakce biologicky aktivních látek z bezových výlisků*. Brno, 2016. Bakalářská práce, Vysoké učení technické, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

CH ₂ O ₂	kyselina mravenčí
CH ₃ COOH	kyselina octová
CH ₃ COONa	octan sodný
CO ₂	oxid uhličitý
Cy3A	kyanidin-3-arabinosid
Cy3Gal	kyanidin-3-galaktosid
Cy3Glu	kyanidin-3-glukosid
Cy3X	kyanidin-3-xylosid
DAD	Diode Array Detector; UV/VIS detektor s diodovým polem
DW	dry weight (sušina)
EtOH	ethanol
FW	fresh weight (čerstvé plody)
g	gram
HCl	kyselina chlorovodíková
Hg	rtuť
HPLC	High Pressure/Performance Liquid Chromatography; vysokotlaká/vysoce účinná kapalinová chromatografie
H ₃ PO ₄	kyselina trihydrogenfosforečná
KCl	chlorid draselný
LDL	low-density lipoprotein
MF	mobilní fáze
mg	miligram
min	minuta
ml	mililitr
MS	Mass Spectrometry; hmotnostní spektrometrie
nm	nanometr
NP-LC	normal phase-liquid chromatography (systém normálních fází)
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity (schopnost pohlcovat volné radikály)
PDA	PhotoDiode-Array
PEEK	PolyEtherEtherKeton
RP-LC	reverse phase-liquid chromatography (systém obrácených fází)
TFA	TriFluoroAcetic/trifluoroctová kyselina
UV	UltraViolet; ultrafialové záření
VIS	Visible; viditelné záření
v/v	volume/volume (objem/objem)
W	voda
μl	mikrolitr

8. SEZNAM POUŽITÝCH PŘÍLOH

Příloha 1: Ukázka vybrané extrakce výlisků

Příloha 2: Průměrná absorbance anthokyanů stanovovaných pH diferenciální metodou

Příloha 3: Exponenciální kalibrační přímka fruktózy

9. PŘÍLOHY

Příloha 1: Ukázka vybrané extrakce výlisků



Příloha 2: Průměrná absorbance anthokyanů stanovovaných pH diferenciální metodou

Vzorek	Extrakce	Průměrná absorbance [nm]			
		pH 1		pH 4,5	
		510	700	510	700
1.	voda, 13 hod.	0,599	0,001	0,054	0,002
2.	voda, 14 hod.	0,611	0,001	0,054	0,002
3.	EtOH + V, 13 hod.	0,695	0,003	0,107	0,004
4.	EtOH + V, 14 hod.	0,989	0,001	0,093	0,002
5.	EtOH, 13 hod.	0,780	0,011	0,073	0,012
6.	EtOH, 14 hod.	1,511	0,023	0,154	0,027
7.	usušené, V, 13 hod.	0,329	0,001	0,037	0,001
8.	usušené, V, 14 hod.	0,364	0,001	0,038	0,001
9.	pomleté, V, 13 hod.	0,113	0,001	0,012	0,001
10.	pomleté, V, 14 hod.	0,173	0,001	0,018	0,001
11.	usušené, EtOH + V, 13 hod.	1,354	0,008	0,150	0,008
12.	usušené, EtOH + V, 14 hod.	1,387	0,007	0,139	0,006
13.	pomleté, EtOH + V, 13 hod.	0,490	0,004	0,057	0,003
14.	pomleté, EtOH + V, 14 hod.	0,530	0,003	0,067	0,008
15.	PFE, pomleté, EtOH + V	0,346	0,003	0,044	0,004
16.	PFE, usušené, EtOH + V	0,373	0,002	0,053	0,006
17.	aroniová šťáva	1,891	0,081	0,230	0,075

Příloha 3: Exponenciální kalibrační přímka fruktózy

