

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

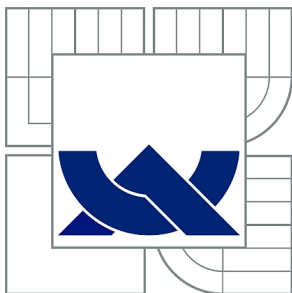
CHARAKTERIZACE PLODŮ ARONIE (ARONIA MELANOCARPA) A
MUCHOVNÍKU (AMELANCHIER ALNIFOLIA)

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

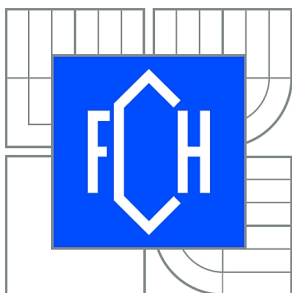
Bc. LENKA BUTOROVÁ

BRNO 2014



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

CHARAKTERIZACE PLODŮ ARONIE (ARONIA MELANOCARPA) A MUCHOVNÍKU (AMELANCHIER ALNIFOLIA)

CHARACTERISATION OF CHOKEBERRY AND SASKATOON BERRY FRUITS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. LENKA BUTOROVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. EVA VÍTOVÁ, Ph.D.

BRNO 2014



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0817/2013	Akademický rok: 2013/2014
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Lenka Butorová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	Ing. Eva Vítová, Ph.D.	
Konzultanti:	RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.	

Název diplomové práce:

Charakterizace plodů aronie (*Aronia melanocarpa*) a muchovníku (*Amelanchier alnifolia*)

Zadání diplomové práce:

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

Termín odevzdání diplomové práce: 9.5.2014

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

Bc. Lenka Butorová
Student(ka)

Ing. Eva Vítová, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

Tato práce vznikla za podpory projektu BiochemNet - Vytvoření sítě pro podporu spolupráce biomedicínských pracovišť a zvýšení uplatnitelnosti absolventů biochemických oborů v praxi (registrační číslo CZ.1.07/2.4.00/31.0133). Projekt je realizován v rámci Operačního programu vzdělávání pro konkurenceschopnost, který je spolufinancovaný z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu ČR.

BiochemNet 



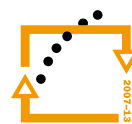
evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá charakterizací plodů aronie (*Aronia melanocarpa*) a muchovníku (*Amelanchier alnifolia*). Teoretická část práce pojednává o botanickém zařazení, chemickém složení, léčivých účincích a použití plodů aronie a muchovníku v potravinářském průmyslu. Dále je pozornost věnována přehledu metod pro stanovení důležitých antioxidantů, se zaměřením na stanovení polyfenolických látek, anthokyanů, kyseliny askorbové a celkové antioxidační aktivity.

Experimentální část práce se zaměřuje na stanovení vybraných parametrů různých odrůd aronie a muchovníků sbíraných v letech 2012 a 2013 pomocí spektroskopických a chromatografických technik s důrazem na vliv rozpouštědla (50% ethanol, destilovaná voda, DMSO) na uvedené parametry. Konkrétně je v práci zjišťován celkový obsah polyfenolických látek a anthokyanů, barevné charakteristiky pomocí systému CIE L*a*b* a schopnost vzorku redukovat železité ionty pomocí metody UV-VIS-NIR spektroskopie. Dále je kvantifikován obsah kyseliny askorbové v extraktech z plodů aronie a muchovníků pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s využitím detektoru s diodovým polem a také celková antioxidační aktivita metodou DPPH a ABTS s využitím elektronové paramagnetické rezonance.

ABSTRACT

Diploma thesis deals with the characterization of chokeberry (*Aronia melanocarpa*) and saskatoon berry (*Amelanchier alnifolia*) fruits. The theoretical part focuses on the botanical classification, chemical composition, curative effects and the use of chokeberry and saskatoon berry in the food industry. Further, the attention is also devoted to a review of methods for the determination of important antioxidants, specialized on the determination of polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid and total antioxidant activity.

The experimental part of the work deals with the determination of selected parameters in different varieties of chokeberry and serviceberry, harvested in 2012 and 2013 using spectroscopic and chromatographic techniques with an emphasis on effect of solvent (50% ethanol, distilled water, DMSO). Specifically total content of polyphenols and anthocyanins, color characteristics using the CIE L*a*b* system and the ability of the sample to reduce the iron are determined using the UV-VIS-NIR spectroscopy. Further ascorbic acid concentration in individual extracts is quantified by High performance liquid chromatography coupled with a diode array detector and the total antioxidant activity is characterized by electron paramagnetic resonance involving DPPH and ABTS^{•+} assays.

KLÍČOVÁ SLOVA

aronie, muchovník, antioxidační aktivita, anthokyany, vitamin C, HPLC, UV/VIS/NIR, EPR spektroskopie

KEY WORDS

chokeberry, saskatoon berry, antioxidant activity, anthocyanins, vitamin C, HPLC, UV/VIS/NIR, EPR spectroscopy

BUTOROVÁ, L. Charakterizace plodů aronie (*Aronia melanocarpa*) a muchovníků (*Amelanchier alnifolia*). Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 103 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Eva Vítová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí diplomové práce Ing. Evě Vítové Ph.D. a konzultantce RnDr. Mileně Vespalcové Ph.D. za odborné vedení ochotnost, čas a cenné rady. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Martinu Polovkovi Ph.D. a Ing. Blance Tobolkové z VÚP v Bratislavě za vstřícnost, přátelský přístup, laboratorní zázemí a cenné rady při zpracování experimentální části práce.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	<i>Aronia melanocarpa</i> – Temnoplodec černoplodý.....	8
2.1.1	Chemické složení	9
2.1.2	Léčivé účinky	17
2.1.3	Nežádoucí účinky	19
2.1.4	Použití.....	19
2.2	<i>Amelanchier alnifolia</i> – Muchovník olšolistý.....	21
2.2.1	Chemické složení	22
2.2.2	Léčivé účinky	25
2.2.3	Nežádoucí účinky	26
2.2.4	Použití.....	26
2.3	Instrumentální techniky vhodné pro charakterizaci plodů vybraného ovoce.....	27
2.3.1	UV-VIS-NIR spektroskopie.....	27
2.3.2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	28
2.3.3	Elektronová paramagnetická rezonance (EPR).....	30
2.4	Metody vhodné pro charakterizaci plodů vybraného ovoce	34
2.4.1	Stanovení celkového obsahu polyfenolických látek	34
2.4.2	Stanovení celkových anthokyanů.....	35
2.4.3	Stanovení jednotlivých anthokyanů	37
2.4.4	Stanovení barevných charakteristik v systému CIE L*a*b*.....	39
2.4.5	Stanovení koncentrace vitamínu C.....	41
2.4.6	Metody vhodné pro stanovení antioxidační aktivity	42
2.5	Statistické metody	47
3	CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	48
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	48
4.1	Analyzované vzorky.....	48
4.2	Laboratorní vybavení	49
4.3	UV-VIS experimenty	50
4.3.1	Příprava extraktů pro UV-VIS experimenty	50
4.3.2	Stanovení celkového obsahu polyfenolů.....	50
4.3.3	Stanovení anthokyanů pH diferentní metodou.....	50
4.3.4	Stanovení barevných charakteristik v systému CIE L*a*b*.....	51
4.3.5	Stanovení schopnosti vzorku redukovat železo (metoda FRAP).....	51
4.4	HPLC experimenty.....	52
4.4.1	Příprava extraktů pro HPLC experimenty.....	52
4.4.2	Stanovení kyseliny askorbové.....	52
4.5	EPR experimenty.....	53
4.5.1	Příprava extraktů pro EPR experimenty.....	53
4.5.2	Stanovení radikál-zhášecí aktivity s využitím radikálů *DPPH a ABTS ⁺	53
4.6	Statistické zpracování výsledků	54
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	54
5.1	Stanovení celkových polyfenolů (TPC).....	54
5.1.1	Vliv extrakčních podmínek na obsah polyfenolů v odrůdách aronie.....	55

5.1.2	Vliv extrakčních podmínek na obsah polyfenolů v odrůdách muchovníku.....	57
5.2	Stanovení celkových anthokyanů v odrůdách aronie a muchovníků	58
5.2.1	Vliv extrakčních podmínek na obsah anthokyanů u odrůd aronie	58
5.2.2	Vliv extrakčních podmínek na obsah anthokyanů u odrůd muchovníku	59
5.3	Stanovení barevných charakteristik v plodech aronie a muchovníků	60
5.3.1	Vliv extrakčních podmínek na barevné charakteristiky aronie	60
5.3.2	Vliv extrakčních podmínek na barevné charakteristiky muchovníku	61
5.4	Stanovení schopnosti aronie a muchovníku redukovat železité ionty.....	63
5.4.1	Vliv extrakčních podmínek na redukční schopnost extraktů aronie	63
5.4.2	Vliv extrakčních podmínek na redukční schopnost extraktů muchovníku	63
5.5	Stanovení kyseliny askorbové v plodech aronie a muchovníků	64
5.5.1	Koncentrace kyseliny askorbové v odrůdách aronie.....	65
5.5.2	Koncentrace kyseliny askorbové v odrůdách muchovníku.....	66
5.6	Stanovení \cdot DPPH radikál-zhášecí aktivity plodů aronie a muchovníků	67
5.6.1	Vliv extrakčních podmínek na \cdot DPPH radikál-zhášecí aktivitu aronie.....	67
5.6.2	Vliv extrakčních podmínek na \cdot DPPH radikál-zhášecí aktivitu muchovníku..	69
5.7	Stanovení ABTS $^{*+}$ radikál-zhášecí aktivity plodů aronie a muchovníku	71
5.7.1	Vliv extrakčních podmínek na ABTS $^{*+}$ radikál-zhášecí aktivitu aronie	71
5.7.2	Vliv extrakčních podmínek na ABTS $^{*+}$ radikál-zhášecí aktivitu muchovníku	73
5.8	Statistické zhodnocení výsledků	75
5.8.1	Statistické porovnání ethanolových extraktů aronie a muchovníků.....	75
5.8.2	Statistické porovnání vodných extraktů aronie a muchovníků	79
5.8.3	Statistické porovnání extraktů aronie a muchovníků v DMSO.....	83
5.8.4	Statistické porovnání extrakční účinnosti všech tří rozpouštědel	86
6	ZÁVĚR.....	91
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	92
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	100
9	SEZNAM PŘÍLOH	102
10	PŘÍLOHY	102

1 ÚVOD

V současnosti je trendem dbát o své zdraví a dodržovat zdravou životosprávu. Proto se konzumenti stále častěji snaží do svého jídelníčku zařadit zdravé, výživově bohaté potraviny s vyváženým poměrem vitaminů, minerálů, vlákniny a antioxidantů. Výborným zdrojem zdraví prospěšných látek je ovoce a zelenina.

V průběhu let byly vypěstovány a vyšlechtěny mnohé ovocné druhy. Některé ovoce se pěstuje pro komerční účely dodnes, na jiné se pozapomnělo. Mezi méně známé ovoce lze zařadit například temnoplodec černoplodý (*Aronia melanocarpa*), běžněji nazývaný aronie nebo muchovník olšolistý (*Amelanchier alnifolia*). Oba ovocné druhy pocházejí ze Spojených států amerických a Kanady. Obsahují polyfenolické látky, minerály a vitaminy, které mohou pozitivně přispět k léčbě nejrůznějších onemocnění. V dnešní společnosti celkově stoupá počet civilizačních chorob, které souvisejí s působením volných radikálů, proto vzrůstá snaha ochraňovat organismus před jejich nadměrnou tvorbou. K eliminaci jejich působení přispívá vyšší příjem exogenních antioxidantů, které se nacházejí v mnoha druzích ovoce včetně aronie a muchovníku. Díky tomuto faktu vzrůstá tendence sledovat a využívat antioxidační vlastnosti přírodních látek, rostlinných extraktů a potravinových doplňků.

Předložená diplomová práce se zabývá charakterizací plodů aronie a muchovníků se zaměřením na stanovení nutričně významných látek s antioxidačním účinkem. Teoretická část práce se zaměřuje na shrnutí dosavadních poznatků o chemickém složení, léčebných účincích, využití a metodách používaných pro charakterizaci plodů aronie a muchovníků. Experimentální část diplomové práce se zaměřuje na stanovení vybraných fyzikálně-chemických parametrů u vzorků aronie a muchovníků pomocí UV-VIS-NIR spektroskopie (zejména celkový obsah polyfenolických látek, celkový obsah anthokyanů, stanovení barevných charakteristik a schopnosti vzorku redukovat železo). Dále je pozornost věnována kvantifikaci kyseliny askorbové v extraktech z těchto plodů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s využitím detektoru s diodovým polem. Významnou částí experimentální práce je také sledování antioxidačních, radikál-zhášecích vlastností extraktů pomocí elektronové paramagnetické rezonance. V neposlední řadě, pozornost se věnuje vlivu rozpouštědel s různou polaritou na sledované fyzikálně-chemické parametry. Všechny výsledky byly zhodnoceny a vzájemně korelovány s využitím metod vícerozměrné statistiky, s cílem posoudit vliv rozpouštědla, druhu ovoce, odrůdy a roku produkce na sledované kvalitativní parametry.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 *Aronia melanocarpa* – Temnoplodec černoplodý

Říše:	rostliny (<i>Plantae</i>)
Podříše:	vyšší rostliny (<i>Cormobionta</i>)
Oddělení:	krytosemenné (<i>Magnoliophyta</i>)
Třída:	vyšší dvouděložné (<i>Rosopsida</i>)
Řád:	růžotvaré (<i>Rosales</i>)
Čeleď:	růžovité (<i>Rosaceae</i>)
Rod:	<i>Aronia</i>
Druh:	<i>Aronia melanocarpa</i>

Temnoplodec, běžněji nazývaný aronie, je keř, který patří do čeledi růžovité (*Rosaceae*), stejně jako jeřáb. Z důvodu velké podobnosti plodů aronie s jeřábem je lidově také nazývána černá jeřabina nebo černý jeřáb. Rod *Aronia* zahrnuje tři odlišné druhy: *Aronia melanocarpa* (Temnoplodec černoplodý) (Obr. 1), *Aronia arbutifolia* (Temnoplodec plankolistý) a *Aronia prunifolia* (Temnoplodec třešňolistý). Jsou nazývány podle barvy plodů *Aronia melanocarpa* – černá aronie a *Aronia arbutifolia* – červená aronie. *Aronia prunifolia* je hybridem obou, ačkoli někteří botanici ji považují za samostatný druh, její plody mají fialovou barvu [1, 2].



Obr. 1: *Aronia melanocarpa* [3]

Botanická charakteristika

Aronia melanocarpa je opadavý keř, který dorůstá výšky 0,5–3 m. Listy jsou celokrajné, eliptické, tmně zelené, lesklé dorůstající délky cca 6 cm. Bílé květy o průměru 1,5 cm, které jsou uspořádány v chocholících, vyrůstají v květnu. Plodem jsou černě zbarvené malvice o průměru 6–13 mm a hmotnosti 0,5–2 g, které dozrávají koncem srpna až začátkem září a mají dlouhou sklizeň okolo čtyř až šesti týdnů. Jejich slupka je pevná a dužnina je tmavě fialová se svíravou, natrpklou chutí. Jedná se o nejčastěji pěstovaný druh ve východní Evropě pro získání plodů, které mají uplatnění v potravinářském a kosmetickém průmyslu [1, 2, 4–6].

Výskyt

Aronie pochází z východní části severní Ameriky a Kanady. Zde se rozšířila ve všech nadmořských výškách a rostla divoce od Nového Skotska až k Floridě po celém středovýchodě Spojených států amerických. Ze Spojených států poté byla rozšířena až do Evropy. V roce 1900 ji ruský botanik a šlechtitel I. V. Mičurin přivezl z Ameriky do Ruska a začal ji pěstovat. Mičurin vypěstoval několik odrůd *Aronia melanocarpa*. Z bývalého Sovětského svazu se keř poté rozšířil přes Ukrajinu a Polsko prakticky do celé Evropy. V současnosti se pěstuje ve východní Evropě, Německu, USA a Kanadě. Roste nejčastěji ve vyšších, vlhčích oblastech. Preferuje slunnější stanoviště a snáší nízké teploty [1, 5].

Odrůdy

Divoké druhy aronie se liší od vyšlechtěných odrůd, které se dnes pěstují komerčně. Divoce rostoucí druhy mají tmavě zelené listy, velmi husté větvení, jsou menšího vzrůstu a plody obsahují více tříslovin. Šlechtěných kultivarů je v Evropě a ve Spojených státech velké množství. Známými vyšlechtěnými odrůdami jsou Nero (Česká republika), Rubina (Rusko, Finsko), Viking, Kurkumacki (Finsko), Hugin (Švédsko), Galicjanka (Polsko), Fertödi (Maďarsko), Aron, Hakkija, Ahonnen, Serina (Dánsko), Morton a McKenzie (USA).

Kultivary jako je Nero, Viking a McKenzie jsou druhy vzniklé křížením mezi *Aronia melanocarpa* a *Sorbus aucuparia*. Genetická rozmanitost kultivovaných odrůd je velmi malá. Nero, Viking a Galicjanka jsou téměř identické při srovnání za použití genetických markerů. Šlechtěním aronie černé se zabývali také v České republice ve Šlechtitelské stanici ovocnářské ve Velkých Losinách, kde byla vypěstována odrůda Nero. Tato odrůda má velké šťavnaté plody a vyniká velkou plodností [1, 5–7].

2.1.1 Chemické složení

Obsah chemických látek přítomných v aronii je závislý na mnoha faktorech. Převážně se odlišuje chemické složení u jednotlivých odrůd. Dále může být složení plodů ovlivněno hnojením, způsobem pěstování, místem výskytu, klimatickými podmínkami, zráním, dobou sklizně nebo zacházením při skladování. Aronie je bohatým zdrojem polyfenolických sloučenin, minerálních látek, vitaminů a tříslovin. Od ostatního ovoce se liší vysokým obsahem sorbitolu a polyfenolických látek. Energetická hodnota ve 100 g malvic je 47 kcal. Obsah sušiny aronie je v rozmezí 17–29 hm.%, z čehož 5–10 hm.% připadá na ve vodě nerozpustný materiál [1, 5, 6, 8].

Polyfenolické sloučeniny

Polyfenolické sloučeniny jsou zodpovědné za léčivé účinky aronie. Aronie oproti borůvkám a bezinkám obsahuje vyšší obsah těchto sloučenin (*Tabulka 1*). Konkrétně se jedná o polyfenolické kyseliny, prokyanidiny, anthokyany a flavonoly [5, 9–11].

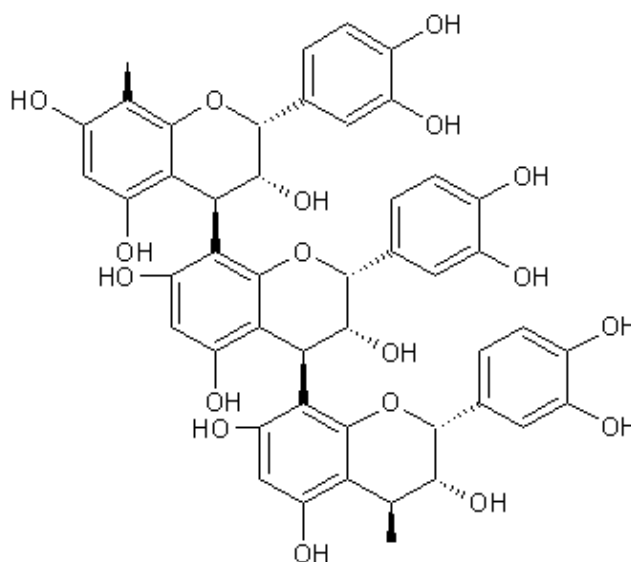
Tabulka 1: Celkový obsah polyfenolických sloučenin ve vybraných druzích ovoce [12]

Ovoce	Polyfenoly celkově [mg/kg]
Aronie	7 194 ± 78
Borůvky	6 180 ± 157
Černý rybíz	5 435 ± 31
Bezinky	4 415 ± 124

Jakobek a kol. [12] ve své práci určili průměrný celkový obsah polyfenolických sloučenin (TPC – Total polyphenolic content) v aronii na 7 194 mg/kg čerstvých plodů. Jednotlivé odrůdy mají rozdílný celkový obsah polyfenolických látek. Odrůda Nero má TPC 3 760 mg/100 g sušiny a odrůda Viking 4 210 mg/100 g sušiny. Obsah těchto látek závisí na zvolené analytické metodě kvantifikace, analyzovaném kultivaru, době sběru, lokalitě růstu a dalších faktorech. Také závisí na způsobu zpracování ovoce. Výlisky z aronie mají větší obsah polyfenolických látek než šťávy nebo samotné plody. Rozdílný obsah polyfenolických sloučenin může mít vliv na výslednou kvalitu ovoce [5, 13–16].

Prokyanidiny

Nejvíce zastoupenou skupinou polyfenolických látek v aronii jsou prokyanidiny (*Obr. 2*). Jsou to fenolické kondenzační produkty, které vycházejí z monomerních pentahydroxyflavanů, resp. většinou (+)-katechinu a (-)-epikatechinu kondenzací mezi polohou C₄ pyranového kruhu a polohou C₆ nebo C₈ aromatického kruhu další molekuly flavanu. Počet kondenzovaných jednotek bývá dva až několik. C₄–C₈ a C₄–C₆ vazby jsou převládající typy vazeb a jedná se o prokyanidiny (PCY – Procyanidins) skupiny B. Aronie obsahuje výhradně homogenní B prokyanidiny, které obsahují jako základní monomer (-)-epikatechin. Gallokatechin nebyl ve struktuře PCY aronie zjištěn. Zastoupení prokyanidinů v aronii je následovné: monomery (0,78 hm.%), dimery (1,88 hm.%), trimery (1,55 hm.%), tetrahexamery (6,07 hm.%), hepta-dekamery (7,96 hm.%) a > dekamery (81,72 hm.%). Celkový obsah PCY v malvicích se v publikacích odlišuje a je v rozmezí 660–5 200 mg/100 g sušiny, celkový obsah PCY ve výliscích je 8 192 mg/100 g sušiny a ve šťávě je 3 652 mg/100 g sušiny [5, 15, 17, 18].

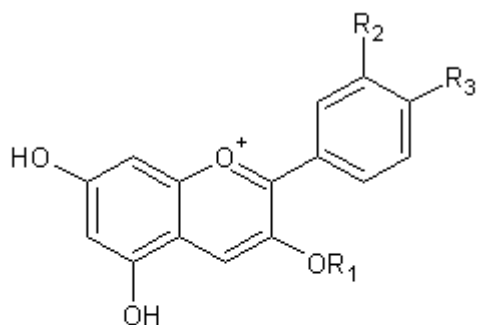


Obr. 2: Chemická struktura prokyanidinů aronie [15]

Anthokyany

Anthokyany (*Obr. 3*) patří do velké skupiny ve vodě rozpustných pigmentů, které řadíme mezi flavonoidy. Způsobují červené, modré, fialové a černé zbarvení ovoce, zeleniny a květin. Používají se jako přírodní potravinářská barviva, zlepšují přitažlivost potravinářských výrobků, a nahrazují dříve používaná azobarviva. Také se používají jako farmaceutické výrobky z důvodu různých terapeutických účinků. Jsou to barviva s antioxidačními,

protizánětlivými, antimikrobními a gastroprotektivními vlastnostmi. Komerční anthokyan se vyrábí ze slupek hroznů, ale i z jiných zdrojů, jako je bez černý nebo plody aronie [19–21].



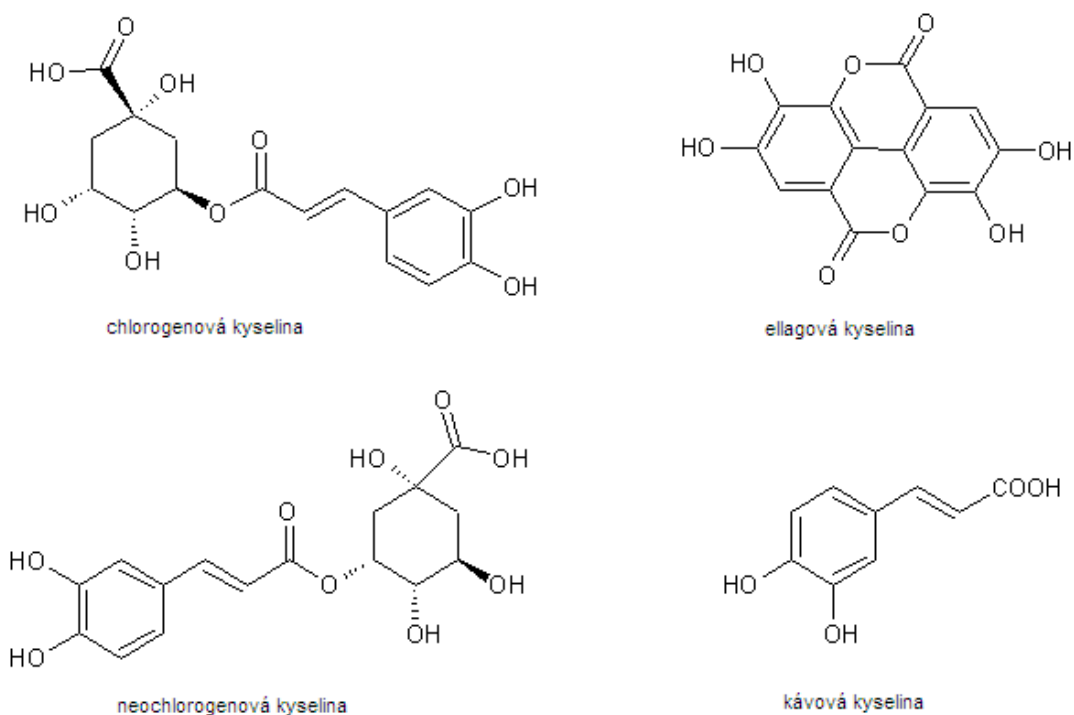
kyanidin-3-O-galaktosid	R1=gal	R2=OH	R3=OH
kyanidin-3-O-glukosid	R1=glu	R2=OH	R3=OH
kyanidin-3-O-xylosid	R1=xyl	R2=OH	R3=OH
kyanidin-3-O-arabinosid	R1=ara	R2=OH	R3=OH
pelargonidin-3-O-arabinosid	R1=ara	R2=H	R3=OH
pelargonidin-3-O-galaktosid	R1=gal	R2=H	R3=OH

Obr. 3: Struktura anthokyanů v aronii [22]

Aronia melanocarpa je jedním z nejbohatších rostlinných zdrojů anthokyanů, obsahující převážně kyanidin glykosidy, nejvíce zastoupeny jsou kyanidin-3-O-galaktosid (64–68,9 hm.%) a kyanidin-3-O-arabinosid (27,5–29 hm.%). Vyskytují se jak ve slupce, tak v ovocné dřevě. Dalšími méně zastoupenými jsou kyanidin-3-O-xylosid a kyanidin-3-O-glukosid. Ve stopových množstvích byly zjištěny pelargonidin-3-O-galaktosid a pelargonidin-3-O-arabinosid. Plody obsahují 725–800 mg/100 g anthokyanů a mají nízkou tendenci k hnědnutí, alespoň ve srovnání s bezem [5, 15, 21, 22]. V aronii anthokyanů představují asi 25 % celkových polyfenolů. Jakobek a kol. [15] ve své práci sledovali obsah anthokyanů v čerstvě lisovaných šťávách aronie (odrůd Aron, Nero a Viking) v průběhu dvou let. V prvním roce zjistili obsah anthokyanů 880–1 400 mg/l a v následujícím roce 1 290–1 970 mg/l. Rozdíly jednotlivých obsahů anthokyanů jsou ovlivněny faktory jako doba sklizně, způsobem pěstování a skladování [5, 15].

Fenolické kyseliny

Plody aronie jsou také bohatým zdrojem fenolických kyselin. V čerstvých plodech je koncentrace fenolických kyselin 96 mg/100 g. Mimo jiné se v plodech aronie nachází kyselina chlorogenová, neochlorogenová, kávová a její deriváty a v malém množství i kyselina ellagová (Obr. 4). Koncentrace kyseliny chlorogenové a neochlorogenové se v jednotlivých studiích značně odlišuje, tak i u jednotlivých odrůd (Tabulka 2) [5, 12, 23]. Jakobek a kol. [12] ve své práci stanovili obsah kyseliny kávové v aronii na 38 mg/kg a kyseliny ellagové na 4 mg/kg. Fenolické kyseliny představují 7,5 % ze všech fenolických sloučenin přítomných v plodech aronie.



Obr. 4: Struktura fenolických kyselin aronie [24]

Tabulka 2: Koncentrace fenolických kyselin v divoké aronii a jejích kultivarech [16]

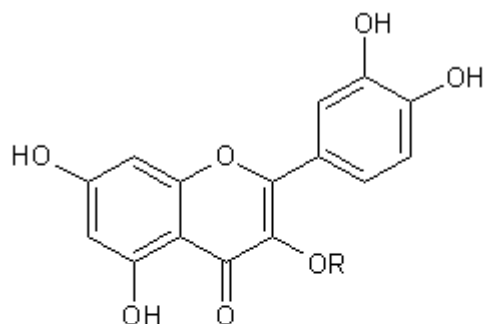
Sloučenina	Koncentrace mg/kg			
	Divoké plody	Viking	Nero	Galicianka
kys. chlorogenová	633 ± 54	670 ± 40	411 ± 10	322 ± 5
kys. neochlorogenová	791 ± 24	1 001 ± 80	673 ± 53	417 ± 5
Celková koncentrace	1 424 ± 77	1 670 ± 120	1 084 ± 63	739 ± 10

Flavonoly

Obsah flavonolů v aronii (Obr. 5) je ve srovnání s ostatními polyfenolickými sloučeninami nižší. Flavonoly představují pouze 1,3 % z celkového obsahu polyfenolických látek. Nejvíce zastoupeným flavonolem v aronii je kvercetin (92 mg/kg) a jeho deriváty, v menší koncentraci se v plodech nachází kempferol (7 mg/kg) a jeho derivát kempferol-3-galaktosid. V plodech aronie byly identifikovány také: kvercetin-3-vicianosid, kvercetin-3-robinobiosid, kvercetin-3-rutinosid, kvercetin-3-galaktosid a kvercetin-3-glukosid. Jejich obsah se odhaduje na více než 71 mg/100 g. Dále byly identifikovány a kvantifikovány kvercetin-3-rutinosid, kvercetin-3-galactosid a kvercetin-3-glucosid v plodech, výliscích a šťávách z aronie (Tabulka 3). Dále v aronii byla zjištěna i přítomnost kvercetin diglukosidu, kvercetin pentosilhexosidu, kvercetin 3-rhamnosyl-galaktosidu, kvercetin-3-arabinopyranosidu a kvercetin dihexosidu [12, 15, 22, 25, 26].

Tabulka 3: Koncentrace flavonolů v mg/100 g sušiny v aronii [15]

Sloučenina	Plody	Výlisky	Šťáva
Kvercetin-3-rutinosid	15,10	13,55	27,53
Kvercetin-3-galaktosid	36,98	47,44	49,76
Kvercetin-3-glukosid	21,64	26,50	31,24



kvercetin	R=H
kvercetin 3-vicianosid	R=6'-O-β-arabinosyl-β-glukosid
kvercetin-3-robinobiosid	R=6'-α-rhamnosyl-β-galaktosid
kvercetin-3-rutinosid	R=6'-α-rhamnosyl-β-glukosid
kvercetin-3-galaktosid	R=β-galaktosid
kvercetin-3-glukosid	R=β-glukosid

Obr. 5: Struktura kvercetinu a jeho derivátů v aronii [22]

Vitaminy

Vitaminy jsou důležitou složkou ovoce. Jedná se o organické sloučeniny, které svou přítomností urychlují nebo dokonce umožňují životní procesy nutné pro udržení zdraví. Působí jako biokatalyzátory. Pro lidský organismus mají nepostradatelnou funkci. Nedostatek vitaminů může vést k vážným onemocněním. Proto je nezbytné, aby byl zajištěn jejich pravidelný přísun v potřebném množství. Vitaminy rozdělujeme podle rozpustnosti na vitaminy rozpustné ve vodě (vitaminy skupiny B, vitamin C a H) a na vitaminy rozpustné v tucích (A, D, E, K). Tepelné opracování ovoce snižuje množství vitaminů v matici [27, 28].

Čerstvé plody aronie obsahují vitaminy B komplexu, konkrétně se jedná o vitamin B₁, B₂, B₃, B₅, B₆ a B₉, dále se v aronii nachází vitamin C, E a K. *Tabulka 4* udává konkrétní obsah jednotlivých vitaminů jak v čerstvých plodech, tak i ve šťávách [5].

Tabulka 4: Koncentrace vitaminů ve šťávě a čerstvých plodech aronie [5]

Vitamin	Šťáva		Čerstvé plody
	Čerstvě lisovaná ^a	Pasterovaná ^b	
B ₁	500 μg/l	NA	180 μg/kg
B ₂	600 μg/l	NA	200 μg/kg
B ₃	3 400 μg/l	NA	3 000 μg/kg
B ₅	2 200 μg/l	NA	2 790 μg/kg
B ₆	550 μg/l	NA	280 μg/kg
B ₉	NA	35 μg/l	200 μg/kg
C	200 mg/l	ND	137 mg/kg
E	NA	NA	17,1 mg/kg
K	NA	NA	242 μg/kg

NA– neanalyzáno, ND–nedetekováno

^a čerstvě připravená šťáva v laboratoři

^b komerční produkt šťáva z aronie (100%, pasterovaná)

Minerální látky

Minerální látky jsou anorganické látky, které jsou nezbytné pro celou řadu životních procesů, jsou důležité pro udržení acidobazické, osmotické rovnováhy v organismu a také jsou potřebné pro lidský organismus jako stavební složky nebo jsou součástí enzymových systémů. Čerstvé plody aronie jsou dobrým zdrojem minerálů. V čerstvých plodech je obsah minerálních látek 440–580 mg/100 g. Podle způsobu zpracování šťávy se liší obsah minerálních látek od 300 do 640 mg/100 ml šťávy. Šťáva z aronie je bohatá na draslík a zinek. Obsah těžkých kovů (olovo, kadmium) v plodech se může měnit v závislosti na čase sběru a vegetačním období. Obsah minerálních látek v aronii je uveden v *Tabulce 5* [5, 29–31].

Tabulka 5: Obsah minerálních látek ve šťávě a čerstvých plodech aronie [5]

Prvek	Šťáva [g/l]		Čerstvé plody [mg/kg]
	Čerstvě lisovaná ^a	Pasterovaná ^b	
Na	5	5,7	26
K	2 850	1 969	2 180
Ca	150	185	322
Mg	140	160	162
Fe	4	0,4	9,3
Zn	1,3	0,6	1,47
I	NA	< 5	NA

NA– neanalyzováno

^a čerstvě připravená šťáva v laboratoři

^b komerční produkt šťáva z aronie (100%, pasterovaná)

Sacharidy

Čerstvé plody aronie obsahují 7,8–18 hm.% redukcujících sacharidů. Celkový obsah sacharidů (glukosy a fruktosy) je 13–17,6 g/100 g čerstvých plodů. Sacharosa v plodech aronie nebyla detekovaná. V čerstvě vylisované šťávě se nachází 30–60 g/l glukosy a 28–58 g/l fruktosy. Aronie obsahuje oproti jiným druhům drobného ovoce také sorbitol, používaný jako náhradní sladidlo, které má poloviční sladivost oproti sacharose. V čerstvě vylisované šťávě z aronie byl stanoven obsah sorbitolu na 80 g/l a u pasterizované šťávy na 55,6 g/l. V extraktu aronie s 1% kyselinou citrónovou bylo kvantifikováno: 0,16 g/l sukralosy, 9,58 g/l fruktosy, 6,29 g/l glukosy a 20,1 g/l sorbitolu [5, 20, 28, 32]. V *Tabulce 6* je uveden přehled koncentrací jednotlivých sacharidů v čerstvé i pasterované šťávě podle práce [15].

Tabulka 6: Koncentrace sacharidů ve šťávách z aronie [15]

Sacharid	Šťáva [g/l]	
	Čerstvě lisovaná ^a	Pasterovaná ^b
Glukosa	41	40
Fruktosa	38	37
Sucralosa	ND	ND
Sorbitol	80	56

ND–nedetekováno

^a čerstvě připravená šťáva v laboratoři

^b komerční produkt šťáva z aronie (100%, pasterovaná)

Lipidy

Čerstvé plody aronie obsahují malé množství lipidů, nejvíce tuků se nachází v semenech aronie. Celkový obsah lipidů v plodech aronie je 0,14 g/100 g čerstvých plodů. Semena obsahují 19,3 g/kg glyceridů. Nejvíce zastoupenou mastnou kyselinou je kyselina linolová. Z celkových fosfolipidů (2,8 g/kg) se v semenech aronie vyskytuje fosfatidylcholin, fosfatidylinositol a fosfatidylethanolamin. Celkové množství sterolů je 1,2 g/kg sušiny, hlavní složkou je β -sitosterol, kampesterol, stigmasterol a avenasterol [5, 33].

Proteiny

Plody aronie obsahují 0,7 g proteinů/100 g čerstvých plodů. Nejvíce zastoupenou aminokyselinou je asparagin, který byl identifikován v čerstvě vylisované šťávě [29].

Vláknina

Vláknina je nestravitelná část rostlinné potravy, která pomáhá pohybu potravy trávicí soustavou, vstřebává vodu a váže na sebe některé látky z potravy, jako například cholesterol nebo kovy (působí např. jako sorbent kadmia). Chemicky sestává vláknina z neškrobových polysacharidů a několika dalších složek rostlin jako je celulóza, hemicelulóza, lignin, vosky, chitiny, pektiny, β -glukany a oligosacharidy. Plody aronie jsou považovány za dobrý zdroj vlákniny obsahující vysoké množství celulósy, hemicelulósy a ligninu. Plody obsahují 5,62 g/100 g vlákniny. V prášcích připravených z aronie byla pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR) identifikována mikrokrytalická celulóza, pektiny, ligniny, polymery kutinu a kondenzované třísloviny. Celkové zastoupení vlákniny v aronii je 72 hm.% sušiny, z toho nerozpustná vláknina představuje 66,6 hm.% sušiny a rozpustná vláknina 5,4 hm.% sušiny [1, 28, 34, 35].

Pektiny

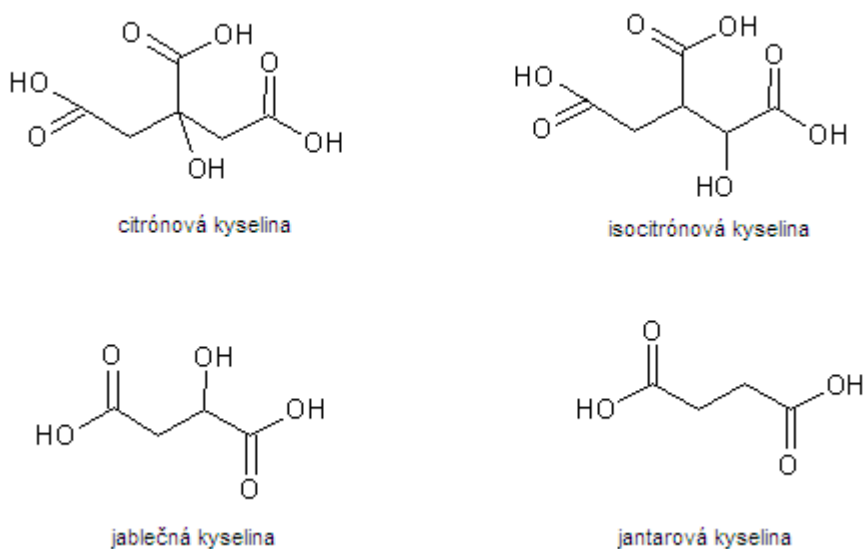
Pektin je tvořen lineárním řetězcem 25–100 jednotek D-galakturonové kyseliny spojených α -(1→4) glykosidickými vazbami. Karboxylové skupiny mohou být esterifikovány methanolem nebo mohou být acetylovány. V řetězci může být galakturonová kyselina nahrazena rhamnosou. Kromě hlavních řetězců galakturonové kyseliny přerušované rhamnosou se zde vyskytuje také řada neutrálních cukrů v postranních řetězcích (L-arabiosa, D-galaktosa, D-xylosa, D-glukosa, D-mannosa, D-glukonová kyselina) [36–39].

Pektinové látky jsou nejvíce zastoupeny v nezralém ovoci. Dozrávající ovoce obsahuje ve svých pletivech ve vodě nerozpustné pektinové látky (protopektiny), které se v průběhu zrání mění účinkem enzymů na koloidně rozpustné pektiny, což se projevuje měknutím pletiv. Nerozpustné pektinové látky se mění na rozpustný pektin buď enzymatickou cestou, nebo také varem se zředěnými kyselinami. Pektin vařením s cukrem a kyselinami tvoří rosol. Tyto vlastnosti pektinu se využívají při zpracování ovoce na džemy, rosoly a marmelády. Čerstvé plody aronie obsahují relativně malé množství pektinů 0,3–1,2 hm.%, protopektin je dominantní pektinovou frakcí v aronii [1, 28, 32, 39].

Organické kyseliny

Organické kyseliny jsou významné složky ovoce dodávající mu příjemnou chuť. Mohou ovlivňovat průběh enzymových a chemických reakcí, mikrobiologickou stabilitu ovoce během skladování, zpracování, sensorické i technologické vlastnosti. Organické kyseliny mají vliv na hodnotu pH. Aronie má hodnotu pH v rozmezí 3,3–3,9 [5, 28].

Celkový obsah organických kyselin je ve srovnání s ostatním ovocem nízký a pohybuje se kolem 1–1,5 hm.%. Hlavní organické kyseliny identifikované v plodech aronie jsou kyselina jablečná a kyselina citrónová. V menších množstvích se nachází kyselina isocitrónová, jantarová a šťavelová. V čerstvě připravené šťávě z rozdílných kultivarů aronie, pocházejících z odlišných míst růstu, byl celkový obsah kyseliny jablečné stanoven na 5–19 g/l. V čerstvé šťávě z aronie byla také kvantifikována kyselina isocitrónová (65 mg/l) a kyselina jantarová (1,5 mg/l) [5, 32]. Chemická struktura kyselin vyskytujících se v aronii je znázorněna na Obr. 6.



Obr. 6: Organické kyseliny vyskytující se v aronii [28]

Aromaticky aktivní látky

Aronie obsahuje především amygdalin, který je zodpovědný za hořko-mandlovou chuť čerstvých plodů. Obsah amygdalinu v aronii je 20,1 mg/100 g, ve šťávě 5,7 mg/100 g a výlisky z aronie obsahují nejvíce amygdalinu 52,3 mg/100 g [1]. Dominantními aromaticky aktivními látkami v aronii jsou benzaldehyd-kyanhydrin, benzaldehyd, ethanol, 2-methylpropan-1-ol, kyselina ethanová, 2-methylpropanová, 3-penten-2-on a 3,9-epoxy-p-menth-1-en. Na aromatickém profilu se podílí také řada derivátů benzenu jako je benzylalkohol, 2-fenylethanol, fenylacetaldehyd, salicylaldehyd, acetofenon, 2-hydroxyacetofenon, 4-methoxyacetofenon, fenol, 2-methoxyfenol a methyl-benzoát [5, 30, 40, 41].

Esenciální oleje z aronie dominantně obsahují benzaldehyd, další látky které dotváří celkové aroma jsou terpeny (skvalen, germacren D, cis-jasmon, α -terpineol), aromatické sloučeniny (benzaldehyd, eugenol, fenylethylalkohol, benzylalkohol a benzonitril), alkany (heneikosan, pentadekan), aldehydy (nonanal, oktanal, trans-2-hexenal, dekanal, heptanal, dodekanal) a alkoholy (hexanol, oktanol, 1-okten-3-ol). Benzaldehyd je dominantní látkou v esenciálním oleji z aronie, jeho obsah je 72,01 %, ostatní látky dotváří aromatický profil [42].

2.1.2 Léčivé účinky

Za léčivé a terapeutické účinky aronie jsou zodpovědné hlavně polyfenolické sloučeniny, minerální látky, vitaminy, organické kyseliny a třísloviny, které se nacházejí v plodech aronie. Mnohé studie prokazují, že aronie má antioxidační, protirakovinné, protimutagenní, kardioprotektivní, hepatoprotektivní, antidiabetické a protizánětlivé účinky. Aronie snižuje krevní tlak, upravuje krevní oběh a je silným antioxidantem. Napomáhá také ke snížení hladiny cholesterolu v krvi, správné funkci jater, zmírňuje potíže s křečovými žilami a otoky a zpomaluje proces stárnutí. Dále příznivě podporuje propustnost, pevnost a pružnost cévních stěn. Vzhledem ke svým pozitivním efektům je vhodným ovocem proti civilizačním onemocněním nebo jako prevence před nimi [5, 10, 25, 43].

Antioxidační účinky

Řada publikací se zabývá studiem antioxidačních vlastností aronie, pomocí různých dobře zavedených *in vitro* a *in vivo* testů, které jsou založené na zjištění přímé antioxidační kapacity. Čerstvé plody aronie mají ve srovnání s ostatním ovocem nejvyšší antioxidační kapacitu měřenou metodou ORAC (Oxygen radical absorbing capacity). Šťávy z aronie mají také nejvyšší hodnoty antioxidační kapacity vyjádřené metodou TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity), dokonce čtyřikrát vyšší než borůvkový, brusinkový džus nebo červené víno (Tabulka 7). Prokyanidiny i anthokyany obsahují O-dihydroxyfenylové skupiny, které jsou vynikající kovová chelatační činidla a tvoří komplexy s Fe^{3+} a Cu^{2+} ionty. Schopnost fenolové složky vázat do struktury bivalentní přechodné kovy snižuje koncentraci těchto kationtů v biologických systémech a potlačuje tak nežádoucí reakce volných radikálů jako např. Fentonovu reakci [5, 12, 44, 45].

Další studie dokazují, že kyanidin deriváty obsažené v aronii jsou silnými vychtávací radikálů DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl) a jsou schopny zabránit v závislosti na dávce žaludečnímu poškození sliznice. Mechanismus, kterým extrakt potlačuje rozvoj žaludečního poškození sliznice, je založen na vytlačování aktivního kyslíku jeho kyanidin deriváty. Antioxidační účinek byl také pozorován u lidí při suplementaci šťávou z aronie, kdy došlo k zamezení oxidačnímu poškození červených krvinek [5, 46–48].

Tabulka 7: Antioxidační kapacita měřená ORAC a TEAC metodou v různých druzích ovoce [5]

Ovoce	ORAC ^a [μ mol TE/g] ^b	TEAC ^c [μ mol/ml] ^d
Aronie	160,2	65–70
Brusinka	18,5	6,7–14,8
Červené hrozny	7,4	17,1–19,8
Jablko	2,2	2,7–4,3
Pomeranč	7,5	3,4–4,8

^a ORAC–Oxygen radical absorbing capacity

^b data vyjádřená v mikromolech Trolox ekvivalentu (TE) na gram čerstvého ovoce

^c TEAC–Trolox equivalent antioxidant capacity

^d data vyjádřená v mikromolech trolox ekvivalentu na mililitr šťávy z ovoce

Protirakovinné účinky

Bylo prokázáno, že extrakt z *Aronia melanocarpa* inhibuje růst a stimulaci apoptózy lidských buněk karcinomu tlustého střeva. Extrakt z aronie dokonce potlačuje tvorbu rakovinných buněk ve větší míře, než extrakty z hroznů a borůvek. Antikarcinogenní potenciál byl dále podpořen údaji ze studie na potkanech léčených na karcinogen azoxymethan. Extrakt z aronie inhiboval tvorbu azoxymethanu, snižoval nahromadění rakovinných buněk ve střevním epitelu a koncentraci žlučové kyseliny [3, 5].

Studie také ukazují, že šťávy a extrakty z aronie mají chemoprotektivní vlastnosti. Kedzierska a kol. [3] ve své práci ukazují, že oxidační stres krevních destiček pacientů s rakovinou prsu může být snížen při aplikaci obchodního extraktu aronie Aronox. Tento extrakt je proto možné považovat za potenciální ochranný prostředek proti vedlejším účinkům vývoje rakoviny prsu a v průběhu léčby, včetně chemoterapie. Sharif a kol. [49] naznačují, že šťávy z aronie mají chemoterapeutické vlastnosti proti akutní lymfoblastické leukemii.

Antimutagenní účinky

Fenolické sloučeniny izolované z *Aronia melanocarpa* mají i antimutagenní účinky. Anthokyany izolované z aronie výrazně inhibují mutagenní aktivitu benzo[*a*]pyrenu a 2-aminofluorenu. Kromě toho šťáva z aronie inhibuje endogenní N-nitrosaminy [5, 50].

Hepatoprotektivní účinky

Studie Kowalczyka a kol. [51] ukazuje, že anthokyany přítomné v aronii by mohly pomoci snížit toxicitu a akumulaci kadmia v ledvinách a játrech. Ionty kadmia jsou schopné s anthokyany tvořit kovové cheláty, čímž se sníží toxické účinky kadmia [52].

Kardioprotektivní účinky

Aronie může pozitivně ovlivňovat několik rizikových faktorů kardiovaskulárních onemocnění. Pokusy *in vitro* ukazují, že fenolové složky přispívají k ochraně a obnově endoteliálních buněk, a v důsledku toho se zlepšuje jejich funkce. Na experimentech s potkany bylo zjištěno, že ovocné šťávy z aronie brání zvýšení celkového plazmatického cholesterolu, LDL (Low Density Lipoprotein) cholesterolu a lipidů plazmy. U mužů s mírnou hypercholesterolémií pravidelné pití šťávy z aronie (250 ml denně) po dobu šesti týdnů vedlo k významnému poklesu sérového celkového cholesterolu, LDL cholesterolu a triglyceridů, zatímco HDL (High Density Lipoprotein) hladina cholesterolu byla zvýšena. Kromě toho bylo zaznamenáno mírné, ale statisticky významné snížení cukru, homocysteinu, fibrinogenu a krevního tlaku. Podobný hypotenzní účinek flavonoidů byl pozorován i u pacientů po infarktu myokardu, léčených současně statiny, a u pacientů s diabetes mellitus II. typu. Další studie se převážně zabývají účinky, které umožňují snížení rizika kardiovaskulárních onemocnění u pacientů po infarktu myokardu a naznačují možné klinické využití jako prevence srdeční ischemické choroby [5, 24, 53–55].

Antidiabetické účinky

Dle dostupných studií se ukázalo, že anthokyany v aronii mohou být užitečné při prevenci a kontrole diabetes mellitus II. typu. Po aplikaci šťávy z aronie potkanům s diabetem došlo ke zmírnění hyperglykémie a hypertriglyceridémie. Ve studii, při které bylo podáváno denně 200 ml šťávy z aronie po dobu 3 měsíců pacientům s non-inzulín dependentním diabetem, došlo ke snížení hladiny glukosy. Dále šťávy z aronie ukázaly příznivý vliv na

celkovou hladinu cholesterolu a lipidů v krvi. Nedávné studie provedené u lidí prokázaly, že šťávy z aronie mohou být užitečné také při léčbě obezity [5, 24, 55].

2.1.3 Nežádoucí účinky

Nežádoucí účinky na lidský organismus zatím nebyly pozorovány. Potenciálním nebezpečím aronie je amygdalin, kyanogenní sloučenina, která dává plodům hořkou mandlovou chuť a vůni, ale je také možnou příčinou vzniku kyanovodíku, těkavé sloučeniny, která je velmi jedovatá. Nejmenší pozorovaná toxická dávka kyanovodíku u dospělých je < 1 mg/g. Dalším nebezpečím je vysoký obsah sorbitolu v plodech, který může vyvolat laxativní účinky a také vysoká konzumace plodů obsahujících dostatek polyfenolických sloučenin může způsobit pokles absorpce minerálů jako je například zinek, měď nebo železo a způsobit tak jejich nedostatek nebo anémii [1, 5].

2.1.4 Použití

Plody aronie byly používány v tradiční medicíně. Potawatomi, domorodí Američané ji využívali k léčbě chřipky. V Rusku a Litvě byly plody aronie převážně používány jako antisklerotický a doplňkový prostředek proti vysokému krevnímu tlaku. V první polovině 20. století byly kultivary aronie představeny v Sovětském svazu a dalších evropských zemích a začaly být využívány v potravinářském průmyslu. V dnešní době jsou z plodů aronie vyráběny různé potravinářské, farmaceutické i kosmetické produkty [1, 24].

Použití v potravinářství

Vzhledem k vysokému obsahu zdraví prospěšných látek v aronii je v současné době využívána jako funkční potravina, zpracovává se v různých podobách a na trhu je k dostání i v bio kvalitě. Aronie má kyselou, adstringentní chuť, proto je vhodnější ke zpracování na produkty než k přímému konzumu. Plody aronie jsou nejčastěji zpracovávány na šťávy, džusy, koncentráty, džemy, želé, kompoty, sladkosti, čaje, likéry, ovocná vína, sušené ovoce nebo se přidávají čerstvé do jogurtů (*Obr. 7*) [1, 5, 24].

Šťáva z aronie má jedinečnou chuť, podobnou trpkost jako brusinková šťáva a více svíravou a méně sladkou chuť než šťáva z černého rybízu. Čistá 100% šťáva však nemá u konzumentů příliš dobré ohlasy, vzhledem k její trpké chuti, proto se častěji zpracovává ve směsích s černým rybízem nebo jablky. Při zpracování šťáv i jiných produktů je vhodné se vyhnout vysokým teplotám, využívat rychlé konzervační nebo sušící metody. Bylo zjištěno, že při vystavení šťávy z aronie teplotě 60 °C po dobu 8 hodin dochází k poklesu obsahu anthokyanů o 30 % a dochází ke ztrátě více jak 50 % antioxidační aktivity [24].

Čerstvé plody aronie se lisují a využívají také jako přírodní potravinářská barviva a nahrazují tak syntetická barviva. Přidává se také do šťáv, světlých vín nebo nápojů. Ke stabilizaci anthokyanů v aronii se přidává do šťáv kořen šišáka bajkalského (*Scutellaria baicalensis*). Tento proces se nazývá kopigmentace, výrazně upravuje kvalitu šťáv a hlavně stabilizuje barvu a obsah anthokyanů [1, 24].

Vzhledem k vyššímu obsahu pektinu v plodech je také využívána k výrobě džemů spolu s ovocem, které má menší obsah pektinu. Aronie se také přidává do džemů za účelem zlepšení barvy, chuti a antioxidačních vlastností [1, 2].



Obr. 7: Potravinářské produkty z aronie [56, 57]

Další použití

Ve farmaceutickém průmyslu jsou z extraktů z aronie vyráběny sirupy nebo doplňky stravy. Na trhu je možné se setkat s tabletami, sirupy a dalšími doplňky stravy v práškové formě (*Obr. 8*). Dále se z aronie vyrábí přírodní kosmetika (*Obr. 8*).

Kromě toho má aronie využití i v zahradnictví, jako okrasný keř a plody slouží jako potrava pro ptactvo. Vzhledem k vysoké odolnosti aronie vůči průmyslovému znečištění a škůdcům je výbornou rostlinou k absorpci bažinaté vody, čehož se také využívá v péči o životní prostředí [1, 2, 24, 56, 58].



Obr. 8: Farmaceutické a kosmetické výrobky z aronie [56, 58]

2.2 *Amelanchier alnifolia* – Muchovník olšolistý

Říše:	rostliny (<i>Plantae</i>)
Podříše:	cévnaté rostliny (<i>Tracheobionta</i>)
Oddělení:	krytosemenné (<i>Magnoliophyta</i>)
Třída:	vyšší dvouděložné (<i>Rosopsida</i>)
Řád:	růžotvaré (<i>Rosales</i>)
Čeleď:	růžovité (<i>Rosaceae</i>)
Rod:	<i>Amelanchier</i>
Druh:	<i>Amelanchier alnifolia</i>

Muchovník je keř nebo malý opadavý strom, který řadíme do čeledi růžovité (*Rosaceae*). Rod *Amelanchier* obsahuje více jak 20 různých druhů. Jednotlivé druhy muchovníku lze dělit podle výskytu na severoamerické, asijské a evropské. V *Tabulce 8* je přehled jednotlivých druhů muchovníků [59, 60].

Tabulka 8: Přehled druhů muchovníků [59]

Latinský název	Český název
<i>Amelanchier alnifolia</i>	<i>Muchovník olšolistý</i>
<i>Amelanchier amabilis</i>	
<i>Amelanchier arborea</i>	<i>Muchovník stromovitý</i>
<i>Amelanchier asiatica</i>	<i>Muchovník asijský</i>
<i>Amelanchier bartramiana</i>	<i>Muchovník Bertramův</i>
<i>Amelanchier canadensis</i>	<i>Muchovník kanadský</i>
<i>Amelanchier cusickii</i>	<i>Muchovník Cusického</i>
<i>Amelanchier fernaldii</i>	
<i>Amelanchier florida</i>	<i>Muchovník květnatý</i>
<i>Amelanchier gaspensis</i>	
<i>Amelanchier grandiflora</i>	<i>Muchovník velkokvětý</i>
<i>Amelanchier humilis</i>	
<i>Amelanchier laevis</i>	<i>Muchovník hladký</i>
<i>Amelanchier lamarckii</i>	
<i>Amelanchier interior</i>	
<i>Amelanchier neglecta</i>	<i>Muchovník přehlížený</i>
<i>Amelanchier nantucketensis</i>	
<i>Amelanchier obovalis</i>	<i>Muchovník opakvejčitý</i>
<i>Amelanchier ovalis</i>	<i>Muchovník vejčitý</i>
<i>Amelanchier sanguinea</i>	<i>Muchovník krvavý</i>
<i>Amelanchier sinica</i>	
<i>Amelanchier spicata</i>	<i>Muchovník klasnatý</i>

Botanická charakteristika

Amelanchier alnifolia (Obr. 9) je opadavý keř nebo malý strom s šedou hladkou kůrou, který dorůstá výšky až 2 m. Listy jsou olivově zelené řapíkaté, jednoduché, různě eliptické, kulaté dorůstající délky až 10 cm. Bílé květy jsou uskupené do vzpřímených nebo převislých hroznů a vyrůstají nejčastěji začátkem jara (březen–duben). Plodem jsou šťavnaté červeně až tmavě fialově zbarvené malvice o velikosti 5–15 mm s příjemnou nasládlou chutí, které dozrávají od poloviny června až do poloviny července [59, 61].



Obr. 9: *Amelanchier alnifolia* [62]

Výskyt

Muchovník pochází z oblasti jižního Yukonu, kanadských prérií a z východní části Severní Ameriky, původní dřevinou je ve Spojených státech amerických a Kanadě. V USA roste ve všech státech kromě Havaje. V Evropě se vyskytuje hlavně ve středním Německu, severní Anglii, Skandinávii a na Slovensku. Dále je rozšířen také v severní Africe, Kavkazu, Krymu, v Pyrenejích, Alpách a Apeninském pohoří. Roste nejčastěji ve vyšších, sušších oblastech. Preferuje slunnější i polostinná stanoviště a snáší nízké teploty až kolem $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ [59, 61, 63, 64].

Odrůdy

V posledních desetiletích byl muchovník kultivován v mnoha částech světa. Kultivary *Amelanchier alnifolia*, které se pěstují v Kanadě a Spojených státech amerických, jsou Honeywood, Martin, Thiessen, Northline, Pembina, Regent, Lee, Nelson, Pearson, Forestburg, Quaker, Parkhill a Smoky [64, 65]. V České republice se také pěstují nové kultivary *Amelanchier alnifolia*, jedná se o kultivary Tišnovský, Brněnský, Ostravský, Školský, NŠ-1 a NŠ-2 [63, 66, 67].

2.2.1 Chemické složení

Obsah chemických látek přítomných v muchovníku je závislý na mnoha faktorech. Převážně se odlišuje chemické složení u jednotlivých odrůd. Složení plodů je ovlivněno také hnojením, způsobem pěstování, místem výskytu, vegetačními podmínkami, zráním, dobou sklizně nebo zacházením při skladování. Muchovník je dobrým zdrojem polyfenolických sloučenin, minerálních látek a vitaminů. Obsah sušiny v muchovníku se pohybuje v rozmezí 15–24 hm.% a energetická hodnota plodů je 356,51 kJ [68].

Polyfenolické sloučeniny

Hlavními polyfenolickými sloučeninami v muchovníku jsou flavonoidy s převahou prokyanidinů a anthokyanů. Fenolické kyseliny a flavonoly jsou méně zastoupené polyfenolické látky v plodech muchovníku. Celkový obsah polyfenolických látek v muchovníku je u jednotlivých kultivarů v rozmezí 2,52–3,82 g/kg [64, 67, 69].

Anthokyany

Anthokyanová barviva jsou majoritní polyfenolické sloučeniny vyskytující se v plodech muchovníku. Jejich celkový obsah v plodech je v rozsahu 25,1–517,9 mg/100 g čerstvých plodů. Anthokyany se nejčastěji vyskytují v plodech v glykosidové formě. Kyanidin je hlavním anthokyanovým aglykonem a na něj v poloze C₃ jsou připojeny jednotky cukru, hlavně galaktosa, glukosa, arabinosa a xylosa. Běžně vyskytujícími se anthokyany v muchovníku jsou kyanidin-3-galaktosid, kyanidin-3-glukosid, kyanidin-3-arabinosid a kyanidin-3-xylosid. Nejvíce zastoupenými anthokyany jsou kyanidin-3-galaktosid (60 %) a kyanidin-3-glukosid (20 %). Minoritní zastoupení má v plodech muchovníku kyanidin-3-arabinosid a kyanidin-3-xylosid. Ve velmi malých množstvích byly identifikovány i další anthokyany, konkrétně delfidin-3-glukosid, malvidin-3-glukosid, malvidin-3-galaktosid, kyanidin-3-xylosid, petunidin-3-glukosid, petunidin-3-galaktosid, kyanidin-3,5-diglukosid. Obsah anthokyanů je ovlivněn faktory jako je stanoviště, rok produkce, zralost a doba sklizně [63, 64, 70, 71].

Prokyanidiny

Prokyanidiny (kondenzované taniny) jsou druhou nejvíce zastoupenou skupinou polyfenolů v muchovníku. Jsou to bezbarvé oligomery nebo polymery flavan-3-olu s antiadhézními, protirakovinnými a antioxidačními účinky. Prokyanidiny muchovníku jsou podobné prokyanidinům jablek. Muchovník obsahuje homogenní B prokyanidiny, které obsahují jako základní monomer (-)-epikatechin. V závislosti na kultivaru plody muchovníku obsahují 3 hm.% PCY, listy a stonky 10–12 hm.%. Obsah PCY v muchovníku je v rozmezí 276–369 mg/100 g plodů [64].

Fenolické kyseliny

Muchovník obsahuje hlavně hydroxyskořicové kyseliny, ale v menším množství se nachází v plodech i hydroxybenzoová kyselina (protokatechová kyselina). Hydroxyskořicové kyseliny představují 18–26 hm.%. V odrůdách Thiessen, Smoky, Honeywood a Nortline byla identifikována kyselina protokatechová, chlorogenová, neochlorogenová a skořicová. Dominantní fenolickou kyselinou je kyselina chlorogenová. *Amelanchier alnifolia* obsahuje také kyselinu 3-ferulokvinikovou a 5-ferulokvinikovou [63, 64].

Flavonoly

Ve zralých plodech muchovníku byly identifikovány kvercetin diglykosidy (kvercetin-3-rutinosid, kvercetin-3-robinobiosid, kvercetin-3-arabinoglukosid) a kvercetin monoglykosidy (kvercetin-3-galaktosid, kvercetin-3-glukosid, kvercetin-3-arabinosid a kvercetin-3-xylosid). Muchovník obsahuje vyšší obsah kvercitrinu, více jak 230 mg/100 g čerstvých plodů a kvercetin-3-rutinosidu (rutinu) 5–93,3 mg/100 g čerstvých plodů. Dále také plody obsahují hyperosid a avicularin [26, 64, 66].

Vitaminy

Muchovník je dobrým zdrojem vitamínu A (přibližně 2 hm.%), vitamínu skupiny B (zejména B₁, B₅, B₆, B₇, B₉) vitamínu C (6 hm.%) a E. Jednotlivé kultivary obsahují 91,5–114,2 mg/100 g kyseliny askorbové [66]. Má dokonce vyšší obsah vitamínu C než pomeranče, jahody nebo kiwi. Semena muchovníku obsahují velké množství vitamínu E (1 053–1 754 mg/kg oleje). Dominantním tokoferolem je α -tokoferol, představuje 87 % celkových tokoferolů [65].

Minerální látky

Čerstvé plody muchovníku jsou bohatým zdrojem minerálních látek, zejména draslíku, železa a hořčíku. Muchovníky jsou také dobrým zdrojem manganu, vápníku, mědi, dusíku, zinku a fosforu. Obsah draslíku je 205–356 mg/100 g plodů, hořčíku 23–30 mg/100 g plodů a železa 12–16 mg/100 g plodů [64, 66, 67].

Sacharidy

Plody muchovníku obsahují 8–12 hm.% redukcujících cukrů, převážně fruktosu, glukosu a sukralosu [68, 72].

Lipidy

Plody obsahují přibližně 0,49 g/100 g tuků. Nejběžněji se v něm vyskytují následující mastné kyseliny: palmitová, stearová, palmitooleová, olejová, linolová, linolenová. V nízkých množstvích se také nachází v plodech kyselina laurová, myristová, arachidonová, behenová a lignocerulová [68].

Obsah oleje v semenech muchovníku je v rozmezí od 9,4–18,7 %. Olej obsahuje především kyselinu linolovou (47–60 %) a olejovou (26–38 %). Olej ze semen muchovníku obsahuje vitamin E. Převládajícími steroly v semenech jsou β -sitosterol, Δ^5 -avenasterol a kampesterol. Obsah sterolů je v rozmezí 7 357–15 771 mg/kg oleje. Olej ze semen muchovníku je dobrým zdrojem dietních tokoferolů, fytosterolů a nenasycených mastných kyselin [65].

Proteiny

Obsah hrubých proteinů v muchovníku je v rozmezí 6,19–11,79 g/kg čerstvých plodů. Nejvíce zastoupenými aminokyselinami jsou kyselina asparagová, glutamová, arginin a leucin [67, 68].

Vláknina

Z nutričního hlediska je muchovník velmi dobrým zdrojem vlákniny. 100 g zmražených plodů obsahuje 6 % vlákniny, což je 24 % denního příjmu. Vláknina přispívá ke snížení rizika srdečních chorob a snižuje vstřebávání cholesterolu [68].

Pektin

Muchovník obsahuje poměrně velké množství pektinu, 8,1–13,8 mg/kg čerstvých plodů. Jeho obsah je srovnatelný s průměrným obsahem u jablek. Vzhledem k vyššímu obsahu pektinu je možné muchovník snadno zpracovávat na džemy [67].

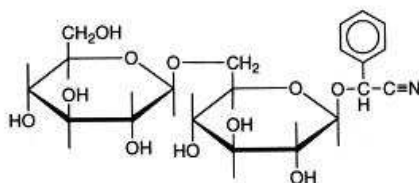
Organické kyseliny

Organické kyseliny dodávající ovoci chuť a ovlivňující celkové pH plodů, které se pohybuje v rozmezí 4,2–4,4 a hodnoty titrační kyselosti jsou v rozmezí 0,36–0,49. Muchovník obsahuje malé množství organických kyselin (1,34–1,79 hm.%). Dominantními jsou kyselina jablečná a citrónová [66].

Karotenoidy, kyanogenní glukosidy a aromaticky aktivní látky

Muchovník obsahuje také karotenoidy, hlavně lutein, zeaxanthin a β -karoten. Lutein je převládající karotenoid, u zralých plodů je jeho koncentrace v rozmezí 300–1 000 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ čerstvých plodů. Zeaxanthin se vyskytuje v muchovníku v rozmezí 60–120 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ čerstvých plodů. Obsah luteinu, zeaxanthinu a β -karotenu je mnohem vyšší v nezralých bobulích než u zrajšího ovoce.

Plody muchovníku také obsahují kyanogenní glykosidy (prunasin a amygdalin). U zralých plodů je obsah amygdalinu v rozmezí 43–129 mg/kg čerstvých plodů a obsah prunasinu 5–19 mg/kg čerstvých plodů [73]. Dominantní látkou, která vytváří aroma muchovníku, je benzaldehyd a amygdalin (*Obr. 10*) [72].



Obr. 10: Struktura amygdalinu [74]

2.2.2 Léčivé účinky

Za léčivé a terapeutické účinky muchovníku jsou zodpovědné hlavně polyfenolické sloučeniny, minerální látky a vitaminy, které se nacházejí v jeho plodech. Studie prokazují, že muchovník má antioxidační, protirakovinné, antidiabetické a protizánětlivé účinky. Vzhledem k vysokému obsahu antioxidačních látek, muchovník má pozitivní vliv na lidské zdraví a je vhodným drobným ovocem k prevenci proti civilizačním onemocněním [64, 67].

Antioxidační účinky

Extrakt z muchovníku má prooxidační i antioxidační aktivitu. Anthokyaniny a polyfenolické sloučeniny obsažené v muchovníku jsou zodpovědné za antioxidační účinky. Kultivar Thiessen a Nelson mají vyšší hodnotu antioxidační aktivity než kultivar Smoky, vzhledem k tomu, že obsahují vyšší obsah látek, které vykazují antioxidační účinky [64].

Protizánětlivé účinky

Extrakt z *Amelanchier alnifolia* inhibuje produkci oxidu dusnatého, čímž působí ochranně proti chronickým zánětům. Vysoký obsah anthokyanů a prokyanidinů způsobuje jeho protizánětlivé účinky. Bovin a kol. [64] srovnávali protizánětlivé účinky šťáv z muchovníku s dalšími šťávami drobného ovoce. Byla testována schopnost inhibovat expresi COX-2 buněk: čím větší schopnost inhibice COX-2 buněk byla pozorována, tím větší protizánětlivé účinky šťávy vykazovaly. Muchovník inhiboval COX-2 buňky z 38 %. Šťávy z angreštu, brusinek, rybízu vykazovaly vyšší protizánětlivé účinky, avšak šťávy z borůvek menší.

Protirakovinné účinky

Wag a kol.[64] demonstrovali, že fenolické sloučeniny muchovníku inhibují produkci oxidu dusnatého a indukují produkci tumor faktoru α a působí jako modulátory imunitní odpovědi na makrofágy. Tato studie prokazuje, že muchovník je schopný redukovat oxidační stres a je zde i diskutována možnost použití proti kardiovaskulárním a chronickým zánětlivým onemocněním. Šťáva z muchovníku je však oproti jiným šťávám z drobného ovoce (např. z angreštu, černého rybízu, malin, brusinek) slabým inhibitorem rakovinných buněk.

Antidiabetické účinky

Kraft a kol. [64] zkoumali antidiabetické účinky muchovníku. Bylo zjištěno, že *A. alnifolia* inhibuje enzym, který způsobuje diabetes a upravuje hladinu glykogenu. Zwang a kol.[75] se zabývali zkoumáním, zda extrakty z listů muchovníku mají antidiabetické účinky. Extrakty z listů muchovníku prokázaly silnou inhibiční aktivitu proti savčí α -glukosidase. Na zvířecím modelu poté byla prokázána silná inhibice α -glukosidasy a snížení koncentrace glukosy v krvi.

2.2.3 Nežádoucí účinky

Doposud nebyly zjištěny výrazné nežádoucí účinky muchovníku. Potenciálním nebezpečím jsou kyanogenní glykosidy (amygdalin a prunasin), které mohou ze struktury uvolňovat těkavý jedovatý kyanovodík. Dalším možným nebezpečím při zvýšené konzumaci plodů, které obsahují dostatek polyfenolických sloučenin, může být pokles absorpce důležitých minerálů [73].

2.2.4 Použití

Domorodci používali plody muchovníku k léčbě různých onemocnění. Tonikum z muchovníku bylo používáno ke zmírnění bolesti žaludku a jater. Dále byly používány plody k léčení průjmu a unavených očí. Čaj z větvíček a listů muchovníku byl používán pro zlepšení zdraví a k léčbě diabetu. Používal se také jako desinfekční prostředek a medikálně k zabránění potratů. Běžně jsou konzumovány čerstvé plody nebo jsou z plodů a listů vyráběny potravinářské výrobky [64, 75, 76].

Použití v potravinářství

Vzhledem k vysokému obsahu zdraví prospěšných látek v současné době jsou plody i listy muchovníku zpracovávány na různé potravinářské produkty (*Obr. 11*). V Kanadě jsou plody běžně k dostání v čerstvém stavu nebo zpracovány na různé potravinářské výrobky jako jsou koláče, muffiny, sušenky, chléb. Dále se z plodů muchovníku vyrábí koncentráty, sirupy, mošty, pivo, víno, cidery, likéry, džemy, želé, zavařeniny, omáčky, náplně do koláčů, salátové dresinky, sušené výrobky, zmrzlina, čokoládové a želé bonbony. Muchovník se také přidává do mletého masa, pokrmů z masa, polévek a jako přísada do salátů. Z muchovníku se vyrábí také Pemmican - směs sušeného masa (z bizona, jelena nebo losa), muchovníku a tuku. Z listů muchovníku je vyráběn čaj [68, 76, 77].



Obr. 11: Potravinářské produkty z muchovníku (cider, sirup, víno, čaj a pemmican)[78, 79]

2.3 Instrumentální techniky vhodné pro charakterizaci plodů vybraného ovoce

V následujících kapitolách je uveden přehled instrumentálních technik vhodných pro charakterizaci plodů aronie a muchovníků. Převážně jsou zmíněny instrumentální techniky, které byly využity v této diplomové práci.

2.3.1 UV-VIS-NIR spektroskopie

UV-VIS-NIR spektroskopie (Ultraviolet-Visible-Near Infrared Spectroscopy) je jednoduchá analytická metoda s nízkými finančními náklady na provedení experimentu (i když vstupní náklady, cena u specializovaných moderních zařízení, jsou poměrně vysoké). Jedná se o rychlou, nedestruktivní metodu, která nevyžaduje náročnou přípravu vzorku, lze jí analyzovat roztoky, suspenze, emulze i silně absorbující látky. Důležité je, aby vzorek obsahoval vazby C-H, N-H, S-H nebo O-H a koncentrace látky, byla větší než 1 g/kg. Využívá se ke kvantitativní analýze vzorků v petrochemii, farmaceutickém, papírenském a potravinářském průmyslu [80, 81].

Princip UV-VIS-NIR spektroskopie

UV-VIS-NIR spektroskopie je založena na absorpci elektromagnetického záření v rozsahu vlnových délek 200–400 nm (UV oblast), 400–700 nm (VIS oblast) a 700–2500 nm (NIR oblast) molekulami vzorku. Molekula se za běžných podmínek nachází na základní vibrační hladině a její elektrony nejsou excitovány. Absorpcí fotonu molekula přijme energii, která způsobí přechod elektronu do vyšší energetické hladiny, dojde k tzv. excitaci a molekula přejde na jednu z mnoha vibračních a rotačních hladin. Fotony z ultrafialové a viditelné oblasti světla mají dostatečnou energii, proto dochází ke změnám elektronových stavů molekul. Fotony z infračervené oblasti mají však nižší energii, proto dochází pouze ke změnám v rotačních a vibračních stavech [82, 83].

Při dopadu záření na povrch tělesa může dojít k odrazu záření, k jeho pohlcení, nebo k průchodu záření. Pokud látka absorbuje záření, dochází ke snížení jeho intenzity. Poměr intenzity záření s určitou vlnovou délkou po průchodu látkou I_t a intenzity dopadajícího záření I_0 se nazývá transmittance T [80]:

$$T = \frac{I_t}{I_0} \quad (1)$$

Hodnota transmitance závisí na vlastnostech absorbující látky, vlnové délce procházejícího světla a množství absorbující látky, tj. na její koncentraci v roztoku a na tloušťce kyvety. Závislost transmitance na těchto veličinách lze definovat vztahem:

$$T = 10^{-\varepsilon \cdot l \cdot c} \quad (2)$$

kde ε je molární absorpční koeficient, l je optická délka kyvety a c je koncentrace látky v roztoku.

Velikost absorpce lze definovat také pomocí absorbance A . Tato veličina udává logaritmický poměr intenzity záření dopadajícího a intenzity záření prošlého vzorkem:

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I_t}\right) = -\log T \quad (3)$$

Algebraickými úpravami rovnic (2) a (3) se získá vztah označovaný jako Lambert-Beerův zákon, který vyjadřuje vztah mezi absorbancí a koncentrací zkoumané látky:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (4)$$

Lambert-Beerův zákon se využívá při kvantitativní analýze. Je zákonem limitním, platí pouze, pokud záření je monochromatické; zkoumané roztoky musí být velmi zředěné ($c < 10^{-2}$ mol/dm³); absorbující prostředí nesmí podléhat žádným změnám a v roztoku musí být jen jedna absorbující složka. Pokud je ve vzorku přítomno více složek, je absorbance sumou absorbancí jednotlivých složek [82, 83].

2.3.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

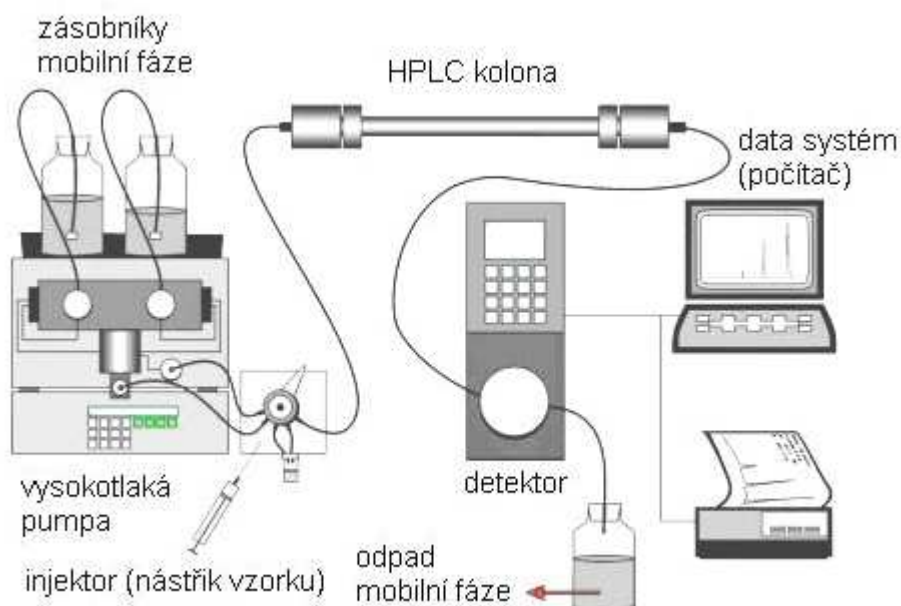
HPLC (High Performance Liquid Chromatography) je separační technika, která se používá pro různé kategorie látek: sacharidy, lipidy, aminokyseliny, vitaminy, aditiva, kontaminanty, syntetická a přírodní barviva. HPLC je použitelná pro separaci termolabilních, méně těkavých, polárních látek a látek s vysokou molekulovou hmotností. Metoda je založena na separaci analytů na základě jejich distribuce mezi stacionární a mobilní fází, která je vždy kapalná. Stacionární fáze je zakotvená v chromatografické koloně. K účinné separaci v HPLC je nutné použít dostatečně malé částice stacionární fáze a velké průtoky mobilní fáze, proto je nutné používat vysokotlaká čerpadla pro dodávku mobilní fáze a konstruovat celý systém tak, aby odolával vysokým tlakům. Během separace dochází k interakci analytu, mobilní i stacionární fáze. V závislosti na povaze stacionární fáze může separace probíhat čtyřmi různými módy: adsorpce, rozdělování, iontová výměna nebo se může uplatňovat molekulový síťový efekt [84, 85].

Podle polarity jednotlivých fází ji rozdělujeme na HPLC s normálními (NP-HPLC–Normal Phase-High Performance Liquid Chromatography) nebo reverzními fázemi (RP-HPLC–Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography). Při použití NP-HPLC je stacionární fáze tvořena látkami polární povahy, jako je silikagel, aminopropyl,

kyanopropyl nebo dioly. Mobilní fáze pak látkami méně polárními, např. n-hexanolem nebo chloroformem. U RP-HPLC se používají polární mobilní fáze, které obsahují maximálně 5 % vody a 95 % organické složky; je možné použít alkoholy (methanol), nitrily (acetonitril), vodu nebo směsi těchto látek. Stacionární fáze je vysoce nepolární a je tvořena silikagelem s chemicky vázanou uhlovodíkovou skupinou – nejčastěji C₈ a C₁₈. Podle volby mobilní fáze můžeme také provádět izokratickou eluci, kdy složení mobilní fáze se v průběhu separace nemění nebo gradientovou eluci, kdy se mění složení mobilní fáze v průběhu separace [84–86].

Princip HPLC

Vzorek se dávkuje dávkovacím ventilem do proudu mobilní fáze, která je čerpaná pomocí vysokotlakého čerpadla a unáší jednotlivé složky vzorku na kolonu, kde dochází k separaci složek na základě opakovaného ustanovení rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází. Analyty opouštějící kolonu jsou detekovány v průtokové cele detektoru. Měřenou veličinou je fluorescence, absorbance, index lomu, elektrická vodivost, dle typu detektoru, který používáme. Záznam je vyhodnocován pomocí vyhodnocovacího zařízení, počítače. Výstupem z detektoru je grafický záznam závislosti odezvy detektoru na retenčním čase, tzv. chromatogram [84]. Na *Obr. 12* je znázorněno schéma HPLC.



Obr. 12: Schéma instrumentace HPLC [87]

2.3.3 Elektronová paramagnetická rezonance (EPR)

Metoda EPR (Electron paramagnetic resonance) patří do skupiny paramagnetických rezonančních metod, stejně jako více známá NMR. Základ EPR položil v roce 1944 sovětský fyzik Yevgeny Zavoisky. EPR je nejpoužívanější metodou pro studium molekul, které obsahují nepárové elektrony jako anorganické a organické volné radikály, radikálové ionty a anorganické komplexy obsahující přechodné kovy. Umožňuje stanovení koncentrace paramagnetických sloučenin a studium reakční kinetiky [88, 89].

Princip EPR

EPR se zabývá studiem chování elektronových spinů v magnetickém poli, je založena na absorpci mikrovlnného záření částicemi s nepárovým elektronem v silném magnetickém poli.

Vychází z chování elektronu. Elektron je rotující, negativně nabitá částice, která se chová jako magnet a je možno mu přiřadit magnetický dipólový moment $\vec{\mu}$. Magnetický moment jakéhokoliv elektronu lze vyjádřit vztahem [88–90]:

$$\vec{\mu} = g_e \cdot \beta_e \cdot M_s \quad (5)$$

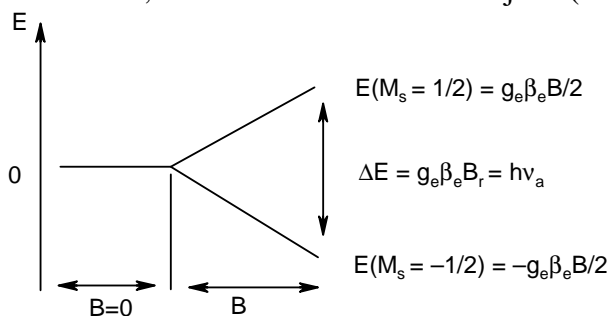
kde: g_e je g-faktor volného elektronu ($g_e = 2,0023192778$)

β_e představuje Bohrov magneton ($\beta_e = 9,2732 \cdot 10^{-24}$ J/T)

Každý elektron má magnetický moment a spinové kvantové číslo $S = 1/2$. V přítomnosti silného vnějšího magnetického pole se uplatňuje magnetické kvantové číslo $M_s = +1/2$ (stav α) nebo $M_s = -1/2$ (stav β), které může nabývat hodnot [91, 92]:

$$M_s = 2 \cdot s + 1 \quad (6)$$

Spin elektronu tedy v magnetickém poli zaujímá jen určité diskrétní orientace, a to buď paralelně, nebo antiparalelně se směrem vnějšího magnetického pole. Ve vnějším magnetickém poli dochází k rozštěpení původní hladiny elektronu na dvě hladiny o různých energetických hodnotách, dochází k tzv. Zeemanovu jevu (*Obr. 13*). [88, 93]



Obr. 13: Zeemanův jev [88]

Pro energii elektronu v magnetickém poli platí vztah:

$$E = \vec{\mu}_s \cdot B = g_e \cdot \beta_e \cdot M_s \cdot B \quad (7)$$

Vzdálenost mezi vytvořenými Zeemanovými hladinami je:

$$\Delta E = \left(\frac{g_e \beta_e B}{2} \right) - \left(- \frac{g_e \beta_e B}{2} \right) = g_e \beta_e B = h\nu \quad (8)$$

kde: h je Planckova konstanta a ν je frekvence zdroje záření

Rovnice (8) je rovnice rezonanční podmínky v EPR. Rezonanční podmínku v EPR lze splnit dvěma způsoby. Buď se měření uskutečňuje při konstantní frekvenci ν , při které se plynule mění indukce magnetického pole až do dosažení rezonance; nebo druhým způsobem, využívaným v pulzní EPR spektroskopii, kdy se při konstantní hodnotě magnetického pole mění frekvence. Častěji je využíván první způsob [89, 90, 93].

Působíme-li na vzorek obsahující nepárové elektrony vysokofrekvenčním elektromagnetickým polem (mikrovlnné záření), jehož vektor magnetické složky je orientován kolmo k vektoru intenzity magnetického pole, potom při splnění rezonanční podmínky $g_e \beta_e B = h\nu$ dojde k absorpci vysokofrekvenční energie. Měření spekter EPR je založeno na registraci této absorpce [93, 94].

Instrumentace EPR

EPR spektrometr se skládá ze zdroje konstantní frekvence (klystrón, Gunnova dioda, patentované tuhé zářiče apod.) v oblasti mikrovln, elektromagnetu s proměnlivou indukcí pole a detektoru, resp. zesilovače, který zaznamenává změnu mikrovlnného záření v závislosti na měnící se indukci pole. Mikrovlnné záření produkované mikrovlnným zdrojem je vedeno přes tzv. vlnovody, jejich rozměry jsou přizpůsobeny použité vlnové délce. Vlnovod sahá až do rezonanční dutiny, která se nachází mezi póly magnetu. Vzorek je umístěn nejčastěji v křemenné kapiláře nebo kyvetě v rezonanční dutině [95].

g-faktor

V každém vzorku může mimo vnějšího magnetického pole o indukci B_{ext} existovat i lokální magnetické pole B_{loc} , jehož vektorovým sčítáním s B_{ext} se získá tzv. celkové efektivní magnetické pole B_{eff} :

$$B_{eff} = B_{ext} + B_{loc} \quad (9)$$

Lokální pole mohou být buď indukovaná vnějším magnetickým polem, která jsou závislá na velikosti tohoto pole, nebo permanentní, nezávislá na velikosti vnějšího magnetického pole. Častější je případ, kdy se lokální magnetické pole v látce indukuje. Pro takovéto látky platí:

$$B_{eff} = B \cdot (1 - \sigma) = \left(\frac{g}{g_e} \right) \cdot B \quad (10)$$

Vztah $(1 - \sigma) = (g/g_e)$ je obdobou stínící konstanty, běžně používané v NMR. Parametr g je tzv. efektivní Zeemanův g -faktor. Každá paramagnetická látka má svoji charakteristickou hodnotu g -faktoru, která slouží k charakterizaci polohy signálu. Odchýlení g od g_e závisí na schopnosti vnějšího magnetického pole B_{ext} indukovat v paramagnetické látce lokální magnetické pole. Charakteristickým rysem mnohých volných radikálů a některých přechodných kovů je, že jejich hodnota g je velmi blízká hodnotě g_e . Naproti tomu mnohé systémy vykazují od této teoretické hodnoty značné odchylky a ve výjimečných případech byly pozorovány i záporné hodnoty g -faktoru. Studium g -faktoru lze získat některé informace o elektronové struktuře studovaného radikálu nebo komplexu [88–90].

Hyperjemná struktura EPR spekter

Jestliže nepárový elektron reaguje pouze s vnějším magnetickým polem, tak ve spektru pozorujeme pouze jednu čáru. To je nejjednodušší případ. Chemické sloučeniny však bývají složeny z atomů, které mají nenulový spinový moment a z toho vyplývá členitost spekter, které přináší informace o vlastnostech a struktuře radikálů. Elektron je tedy ovlivňován

vnějším magnetickým polem a zároveň magnetickým polem jednotlivých jader. Právě magnetické pole jader způsobuje hyperjemnou interakci a následné rozštěpení čar v EPR spektru na tzv. hyperjemnou strukturu. Ke vzájemné interakci mezi spinem jádra a elektronu může dojít dvěma způsoby: dipól-dipólovou interakcí nebo Fermiho konstantní interakcí. Každé jádro je zdrojem magnetického pole, které v závislosti na orientaci jaderného spinu zesiluje nebo naopak zeslabuje lokální magnetické pole. Pro celkové lokální pole poté platí:

$$B_{loc} = B_r + \alpha \cdot m_i \quad (11)$$

kde: α je konstanta hyperjemné interakce (štěpící konstanta),
 m_i je magnetické jaderné kvantové číslo ($I, I-1, \dots -I$),
 B_r je indukce magnetického pole, při které je splněná rezonanční podmínka.

Všeobecně přítomnost n chemicky ekvivalentních jader se spinem I vede ke štěpení všech čar v EPR spektru na $(2 \cdot n \cdot I + 1)$ rezonančních čar. Velikost štěpící konstanty α závisí na rozložení elektronové hustoty v blízkosti interagujících jader. Počet rezonančních čar v EPR spektru spolu s hodnotami štěpících konstant a poloha spektra charakterizovaná hodnotou g -faktoru, jsou důležitými charakteristikami, které umožňují spolehlivou identifikaci radikálů v systému. Z plochy EPR spektra lze zjistit koncentraci radikálů přítomných ve vzorku. Za určitých podmínek (pokud se nemění šířka spektrální čáry) je mírou koncentrace radikálů v systému výška EPR signálu [88–90].

EPR spektroskopie v kapalně fázi

Metoda EPR je omezená pouze na systémy obsahující nepárový elektron, její citlivost však umožňuje studovat i radikálové meziproducty s krátkou dobou života v chemických a biochemických systémech. Vzhledem k časté labilitě těchto sloučenin jsou kladeny vysoké nároky především na výběr vhodných rozpouštědel, ale i dalších reakčních činidel. Přímé metody detekce nízkých hladin volných radikálů, které se běžně používají při studiu fyziologických procesů, jsou limitovány spodním prahem detekovatelnosti EPR spektroskopie (10^{-8} mol/dm³). Vzhledem k tomu, že radikálové procesy probíhají při ještě nižší koncentraci, hranice detekce lze v takových případech posunout pomocí metod nepřímé detekce, např. metody spinových lapačů [95, 96].

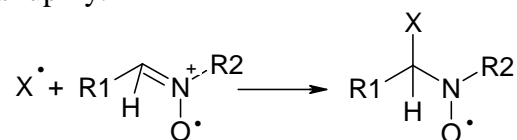
Spinové lapače

Metoda spinových lapačů (spin trapping) je založena na adici kyslíkatých a organických radikálů s krátkou dobou života na molekuly vhodné struktury, které se vyznačují delší dobou života. Sloučeniny, na něž se radikály adují, se nazývají spinové lapače, nejčastěji na bázi nitronů, pyrolinoxidů nebo nitrososloučenin. Z původně diamagnetických lapačů se stávají paramagnetické sloučeniny. Analýza hodnot štěpících konstant a g -faktoru umožňuje následnou charakterizaci (identifikaci) zachyceného radikálu [88, 93, 97].

Spinové lapače na bázi nitronů

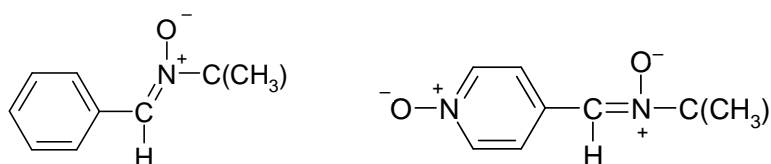
Spinové lapače na bázi nitronů reagují s volnými radikály prostřednictvím atomu uhlíku, který se nachází v α poloze vzhledem k atomu dusíku (*Obr. 14*) Výsledkem adice radikálu X^\bullet na dvojnou vazbu fragmentu $-\text{CH}=\text{N}^+\text{O}^-\text{R}_2$ je vznik stabilního nitroxylového radikálu. Na rozdíl od aplikace nitrososloučenin se v EPR spektru tohoto radikálu kromě základního

dusíkového štěpení a případného štěpení od substituentu R₂ pozoruje ještě dodatečné štěpení od vodíkového atomu –CH skupiny.



Obr. 14: Vznik stabilního nitroxylového radikálu reakcí radikálu X[•] a nitronu [98]

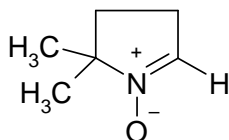
Nejvýznamnějším spin trapem na bázi nitronů je α-fenyl-N-terc-butyl-nitron (PBN, *Obr. 15a*), který má lipofilní charakter. Dalším spinovým lapačem je α-(4-pyridyl-1-oxid)-N-terc-butyl-nitronu (POBN, *Obr. 15b*), který má však hydrofilní charakter [88, 89, 93].



Obr. 15: a) α-fenyl-N-terc-butyl-nitron b) α-(4-pyridyl-1-oxid)-N-terc-butyl-nitronu [89]

Spinové lapače na bázi pyrolinoxidů

Nejvýznamnějším představitelem této skupiny je 5,5-dimethyl-1-pyrolin-N-oxid (DMPO, *Obr. 16*). Molekula DMPO má labilní dvojnou vazbu v heterocyklickém pyrolinovém kruhu, která umožňuje adici radikálů s krátkou životností. Jeho velkou výhodou je rozpustnost v polárních i nepolárních rozpouštědlech a pufrových roztocích, což umožňuje jeho využití i při sledování radikálových reakcí za fyziologických podmínek. Nejčastěji se používá na identifikaci radikálů [•]OH, HOO[•], RO[•], RO₂[•] a různých typů uhlíkem centrovaných radikálů, obecně R[•]. Přestože je DMPO nejpoužívanějším spinovým lapačem kyslíkem centrovaných radikálů, jeho schopnost zachytit hydroperoxylový radikál (HOO[•]) má svá omezení. Jedním z hlavních problémů je krátká životnost [•]DMPO-OH aduktu [98, 99].



Obr. 16: 5,5-dimethyl-1-pyrolin-N-oxid [89]

Spinové značky

Spinové značky lze definovat jako stabilní radikály přidávané záměrně do reakčního systému. Prostřednictvím sledování fyzikálně-chemických vlastností systému v přítomnosti spinové značky je možné určit různé kvalitativní i kvantitativní parametry reakčního systému, např. sledovat kinetiku radikálových reakcí. Metoda spinových značek se v současnosti používá hlavně při studiu biologických systémů (enzymy, lipidy, membrány) a polymerních materiálů. Volba spinové značky závisí na charakteru prostředí a vlastnostech reakčního systému. Při výběru vhodné spinové značky jsou důležitým kritériem strukturální vlastnosti spinových značek a jejich vliv na reaktivitu. Běžně se využívají např. deriváty kyseliny stearové, deriváty 3-karbamoyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-N-oxyl (PROXYL), deriváty spinové značky 2,2,6,6-tetramethylpiperidinyln-oxyl (TEMPO), stabilní radikál [•]DPPH a kation-radikál ABTS^{•+} [95, 100].

2.4 Metody vhodné pro charakterizaci plodů vybraného ovoce

V následujících kapitolách je uveden přehled metod vhodných pro charakterizaci plodů aronie a muchovníků. Převážně jsou zmíněny metody běžně používané v laboratorní praxi s důrazem na ty, které byly využity k v této diplomové práci.

2.4.1 Stanovení celkového obsahu polyfenolických látek

Izolace polyfenolických látek

Nejběžnější metoda používaná k izolaci polyfenolických látek (PC–Polyphenolic Compounds) je extrakce. Vzhledem k velkému množství PC neexistuje standardní metoda pro jejich extrakci. Nejčastěji používanými technikami jsou: extrakce rozpouštědlem a superkritická fluidní extrakce. Před samotnou extrakcí PC z ovoce je vhodné rostlinnou matici rozemlet, rozdrtit, osušit nebo lyofilizovat. Dalšími vhodnými metodami k izolaci PC jsou moderní extrakční techniky: extrakce ultrazvukem, mikrovlnná extrakce, vysokotlaká extrakce, vysokotlaká extrakce rozpouštědlem, extrakce tuhou fází a extrakce pulzním elektrickým polem [101].

Stanovení polyfenolických látek

Nejvíce používaným a nejstarším testem pro zjištění celkového obsahu polyfenolických látek je Folin-Ciocalteuův (FC) test. Metoda je založená na reakci polyfenolických látek s redukčním činidlem (Folin-Ciocalteuovo činidlo), při níž dochází k tvorbě modrého komplexu, který je kvantifikován pomocí UV-VIS (Ultraviolet-Visible Spectroscopy) spektrometrie. Folin-Ciocalteuovo činidlo je směs wolframanu a molibdenanu ve vysoce zásaditém prostředí (5–10% vodný roztok Na_2CO_3). Fenolické látky se energeticky oxidují v zásaditém prostředí, čímž dochází k tvorbě $\text{O}_2^{\bullet-}$, který zase reaguje s molibdenanem za vzniku oxidu molybdenu, MoO_4^+ , který má velmi intenzivní absorpční pás při vlnové délce 750 nm. Nicméně činidlo se v alkalickém prostředí rozkládá, proto je nutné použít nadbytek činidla, aby proběhla celá reakce. To však vede ve většině případů k precipitaci a zvýšení turbidity, což může způsobovat potíže při analýze. K zabránění zvýšení turbidity se k činidlu přidávají soli lithia. Celkové polyfenolické látky zjištěné FC testem jsou nejčastěji vyjádřeny v ekvivalentech gallové kyseliny (GAE–Gallic Acid Equivalent). FC test není selektivní, určuje jak polyfenolické, tak monofenolické látky. Používá se také ke zjištění hrubého odhadu antioxidační aktivity vzorků potravin za předpokladu, že vzorek neobsahuje bílkoviny ve významných množstvích [101, 102]. V této diplomové práci byla pro zjištění TPC použita UV-VIS-NIR spektroskopie.

Stanovení celkového obsahu polyfenolických látek v aronii

Benvenuti a kol. [13] zjistili v methanolovém extraktu odrůdy Nero obsah celkových polyfenolických látek 690 ± 9 mg/100 g čerstvých plodů.

Wu a kol. [44] kvantifikovali TPC v aronii na úrovni 20 mg/g čerstvých plodů. Vzorek byl připraven tak, že 1 g plodů byl mixován s 5 g mořského písku, převeden do 22 ml extrakční baňky a extrahován rozpouštědlem obsahujícím aceton:vodu:kyselinu octovou (v poměru 70:29,5:0,5). Ke stanovení byl použit FC test a výsledky opět byly vyjádřeny jako GAE.

Jakobek a kol. [103] kvantifikovali TPC v aronii na úrovni $10\,637 \pm 571$ mg/kg. Extrakt pro analýzu byl připraven tak, že 5 g rozdrcených bobulí bylo extrahováno v 10 ml horkého

methanolu po dobu 2 minut. Roztok byl přefiltrován. Extrakce residua byla provedena dvakrát a všechny extrakty byly smíchány dohromady. Byl použit FC test.

Jakobek a kol. v další studii [12] určili TPC v aronii pomocí FC testu na $7\,194 \pm 78$ mg/kg. K analýze byl použit mírně kyselý methanolvý extrakt aronie.

Jakobek a kol. v nové studii [16] kvantifikovali TPC v odrůdách Nero, Viking a Galicianka a také v divoké aronii v průběhu dvou let (2010 a 2011). Vzorky byly uchovávány ve zmrazeném stavu při -20 °C. K analýze byl použit zahuštěný ethanolový extrakt. Ke stanovení TPC byl použit FC test.

Stanovení celkového obsahu polyfenolických látek v muchovníku

Rop a kol. [67] kvantifikovali celkový obsah polyfenolických látek v různých kultivarech muchovníku pomocí FC spektrofotometrického testu. Vzorok pro analýzu byl připraven tak, že 10 g plodů bylo homogenizováno 2 hodiny v extrakčním činidle (HCl:methanol:voda, v poměru 2:80:18). Obsah polyfenolů se u jednotlivých odrůd pohyboval v rozmezí 2,9–3,8 g/kg.

Bakowska a kol. [104] kvantifikovali TPC v 15 kultivarech muchovníku pomocí FC testu a určili mírné snížení TPC během skladování při -20 °C po dobu 9 měsíců. K analýze byl použit mírně kyselý methanolvý extrakt plodů muchovníku. TPC byl vyjádřen v GAE.

2.4.2 Stanovení celkových anthokyanů

Metody vhodné pro izolaci anthokyanů

Nejběžnější metoda, která se používá k izolaci anthokyanů v ovoci, je extrakce rozpouštědly. Soxhletova extrakce, izolace zahříváním a vařením nejsou vhodnými izolačními technikami, vzhledem k tomu, že při nich dochází k hydrolyze, oxidaci a ztrátě anthokyanů v důsledku ionizace. Naopak vhodné techniky jsou nové extrakční metody: extrakce ultrazvukem, mikrovlnná extrakce, vysokotlaká extrakce, vysokotlaká extrakce rozpouštědlem a extrakce pulzním elektrickým polem [95, 101, 105, 106]. V této diplomové práci byla použita k izolaci anthokyanů extrakce rozpouštědly.

Extrakce rozpouštědly

Rozdrcené, sušené, lyofilizované nebo čerstvé ovoce je extrahováno vhodným rozpouštědlem. Anthokyaniny jsou polární látky, proto se nejčastěji používají vodné roztoky ethanolu, methanolu a acetonu. Dále se používají k extrakci i kyselé roztoky methanolu nebo ethanolu, případně roztoky těchto rozpouštědel nasycené SO_2 . Extrakce pomocí okyseleného roztoku methanolu je efektivnější než extrakce pomocí okyseleného roztoku ethanolu a také efektivnější než extrakce ve vodných roztocích. Nicméně ethanol se používá v potravinářském průmyslu častěji vzhledem k toxicitě methanolu. Při extrakci okyselenými rozpouštědly je dobré se vyhnout příliš velkému okyselení roztoku, protože by mohlo dojít k hydrolyze anthokyanů. Doporučuje se používat slabé kyseliny (mravenčí, octová) nebo silné kyseliny o nízké koncentraci (chlorovodíková). Extrakce se provádí za studena, vzhledem k degradačním vlastnostem anthokyanů při vyšších teplotách, a extrakční roztok by měl být slabě kyselý, aby byl zachován červený flavyliový kation [101, 105–107].

Metody vhodné pro purifikaci anthokyanů

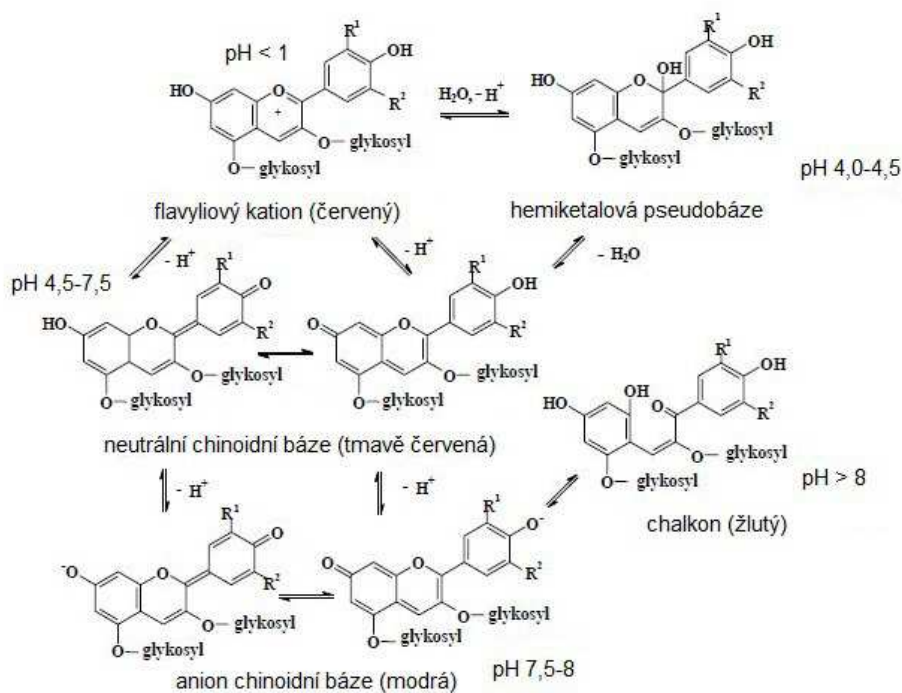
Extrakční techniky však nejsou selektivní pro anthokyany, do roztoku se při extrakci dostanou i další nefenolické složky jako sacharidy, organické kyseliny a proteiny. Proto je nutná po extrakci purifikace anthokyanů. K tomuto účelu se používá řada technik: extrakce na pevnou fázi, extrakce kapalina-kapalina, protiproudá chromatografie, středotlaká kapalinová chromatografie nebo purifikace anthokyanů za použití kapalného a superkritického CO₂ [101, 107].

Metody pro stanovení celkového obsahu anthokyanů

Stanovení anthokyanů má důležitou roli při taxonomických studiích, studiích zaměřených na falšování potravin a hodnocení kvality čerstvé a zpracované suroviny. Spektrální charakteristiky anthokyanů poskytují velmi užitečné kvalitativní a kvantitativní informace, proto je také UV-VIS spektrometrie hlavní technika využívaná ke stanovení anthokyanů. Používá se ke kvantifikaci celkového obsahu anthokyanů (TAC – Total anthocyanin content). Nejčastější využívanou metodou pro zjištění TAC je pH diferentní metoda, která byla použita ke stanovení TAC v této diplomové práci [101, 107].

pH diferentní metoda

Spektrofotometrický test pro kvantifikaci TAC za použití pH diferentní metody je založený na změně struktury anthokyanů při změně pH, což se projevuje rozdílnou absorpcí. Měří se změna absorbance při pH 1 a 4,5. Při pH 1 převažuje barevná oxoniová forma a při pH 4,5 bezbarvá hemiketalová forma (Obr. 17). Rozdíl absorbancí při vlnové délce 520 nm je úměrný koncentraci celkového monomerního pigmentu. Metoda umožňuje rychlé a přesné stanovení celkových monomerních pigmentů a to i za přítomnosti polymerních, degradovaných pigmentů a dalších rušivých sloučenin [108, 109].



Obr. 17: Strukturální formy anthokyanů při různých hodnotách pH [109]

Stanovení celkových anthokyanů v aronii

Benvenuti a kol.[13] kvantifikovali celkový obsah anthokyanů v odrůdě Nero na 461 ± 3 mg/100 g čerstvých plodů. K analýze byl použit mírně kyselý ethanolový extrakt aronie.

Jakobek a kol. [103] kvantifikovali TAC v aronii $4\,341 \pm 22$ mg/kg. 5 g vzorku bylo mixováno 2 minuty ve 20 ml methanolu okyseleného 0,1% HCl, směs byla ponechána v tmavé místnosti 16 hodin a poté filtrována.

Jakobek a kol. [12] stanovili TAC v aronii na $3\,572 \pm 48$ mg/kg. K analýze byl použit methanolový extrakt aronie.

Stanovení celkových anthokyanů v muchovníku

Hu a kol. [71] kvantifikovali TAC ve dvou kultivarech: Thiessen a Smoky. TAC u kultivaru Thiessen byl stanoven na 0,6 mg/g čerstvých plodů a u kultivaru Smoky na 0,41 mg/g čerstvých plodů. K analýze byl použit extrakt plodů s 80% ethanolem, 0,3% kyselinou metafosforečnou a 0,8% kyselinou octovou.

2.4.3 Stanovení jednotlivých anthokyanů

Kromě stanovení celkového obsahu anthokyanů je možné identifikovat a kvantifikovat i některé jednotlivé anthokyanany. Nejběžnější metoda používaná k těmto účelům je vysokotlaká kapalinová chromatografie, k detekci lze použít UV-VIS detektor s diodovým polem (DAD–Diode Array Detector), fluorescenční detektor, hmotnostní spektrometr nebo NMR. Kromě HPLC lze ke stanovení anthokyanů použít také kapilární elektroforézu nebo micelární elektrochromatografii [101].

Stanovení anthokyanů pomocí HPLC

K identifikaci a kvantifikaci anthokyanů se používá systém s reverzní fází RP-HPLC. Stacionární fází tvoří reverzní sorbent C₁₈, který má na povrchu silikagelu navázané alkylové řetězce s 18 uhlíky. Používají se polymerní náplně kolon v širším rozsahu pH. Mobilní fází tvoří gradientový systém rozpouštědel acetonitrilu a vody nebo směsi methanolu a vody s malým množstvím kyseliny, které je důležité pro stabilizaci anthokyanů a tvorbu ostrých píků. Nejčastěji používané kyseliny jsou fosforečná, chloristá, octová a mravenčí. Mobilní fáze musí mít pH v kyselé oblasti (optimálně < pH 2), aby vznikl stabilní flavyliový kation, který je zbarvený do červena a poskytuje charakteristické absorpční maximum při 520 nm. Při této vlnové délce lze přesně identifikovat a kvantifikovat jednotlivé anthokyanany v přítomnosti jiných polyfenolických sloučenin. Využívá se hlavně UV-VIS detektoru s diodovým polem, který provádí kompletní spektrofotometrické skenování každého eluovaného píku, čímž poskytuje specifický chromatogram. Tyto chromatogramy mohou být použity pro srovnání s jinými spektry anthokyanů a lze tak identifikovat jednotlivé anthokyanany. Spektrální charakteristiky anthokyanů souvisí s polohou a počtem hydroxylových skupin na aglykonovém skeletu. Substituované cukry ve struktuře anthokyanů nemají vliv na spektrální charakteristiky, pouze ovlivňují retenční čas. Acylace anthokyanů má velký vliv na zvýšení retenčního času ve srovnání s neacylovanými anthokyanany [110–112].

Stanovení anthokyanů v aronii pomocí HPLC

Pomocí HPLC-DAD Ochmian a kol.[113] v plodech aronie identifikovali a kvantifikovali kyanidin-3-arabinosid, kyanidin-3-galaktosid, kyanidin-3-glukosid a kyanidin-3-xylosid. K analýze byl použit methanolvý extrakt plodů aronie. Separace probíhala na koloně Cadenza CS C18 (75 mm x 4,6 mm, 5 μm) při teplotě kolony 20 °C. Mobilní fáze obsahovala 21 % rozpouštědla A (4,5% kyselina mravenčí, pH 2,2) a rozpouštědlo B (acetonitril). Byl použit lineární gradient od 0 % B do 21 % B (0–30min). Rychlost toku mobilní fáze byla 1 ml/min a anthokyany byly monitorovány při 520 nm. Spektra byla měřena v rozmezí vlnových délek 200–600 nm. Retenční časy a spektra byly srovnány se standardy.

Oszmiański a Wojdylo [15] identifikovali a kvantifikovali jednotlivé anthokyany v plodech *Aronia melanocarpa* pomocí HPLC-DAD. K analýze byl použit methanolvý extrakt. Separace probíhala na koloně Sybergi Fusion RP-80A Phenomenex (150 x 4,6 mm, 4 μm), teplota kolony byla 30 °C. Mobilní fáze obsahovala rozpouštědlo A (2,5% kyselinu octovou) a rozpouštědlo B (acetonitril). Program začal s lineárním gradientem od 0 % B do 25 % B. Rychlost mobilní fáze byla nastavena na 1 ml/min a anthokyany byly monitorovány při 520 nm. Spektra byla měřena v rozmezí vlnových délek 240–600 nm a srovnána se standardy. Byly identifikovány a kvantifikovány následující anthokyany: kyanidin-3-galaktosid, kyanidin-3-glukosid, kyanidin-3-arabinosid a kyanidin-3-xylosid.

Jakobek a kol. [103] identifikovali a kvantifikovali kyanidin-3-galaktosid, kyanidin-3-glukosid, kyanidin-3-arabinosid a kyanidin-3-xylosid v aronii pomocí HPLC s UV detekcí. K analýze byl použit methanolvý extrakt. Separace probíhala na OmniSpher C18 koloně. Mobilní fáze obsahovala rozpouštědlo A – kyselinu fosforečnou a rozpouštědlo B – methanol, za následujících elučních podmínek: 3–65% B 0–38 min, 65 % B 38–45 min. Teplota kolony byla 20 °C, rychlost průtoku mobilní fáze (MF) 1 ml/min. Spektra byla snímána v rozmezí vlnových délek 190–600 nm a srovnána se standardy.

Stanovení anthokyanů v muchovníku pomocí HPLC

Lavola a kol. [63] identifikovali a kvantifikovali kyanidin-3-galaktosid, kyanidin-3-glukosid, kyanidin-3-arabinosid a kyanidin-3-xylosid v kultivarech Thiessen, Smoky, Honeywood a Northline pomocí HPLC-DAD. Vzorek bobulí byl nejprve homogenizován v okyseleném acetonu a poté centrifugován. Tato procedura byla provedena 4krát a supernatant byl slit dohromady a zakoncentrován tak, aby neobsahoval aceton, poté byl znovu rozpuštěn ve 2 ml 1% kyselině mravenčí a analyzován na HPLC. Separace byla prováděna na koloně RP C18 koloně (100 mm x 2,1 mm), byla použita gradientová eluce za použití mobilní fáze obsahující jako rozpouštědlo A kyselinu mravenčí a jako rozpouštědlo B methanol. Kvantifikace anthokyanů byla provedena srovnáním s kalibračními křivkami standardů a identifikace anthokyanů srovnáním s UV-VIS spektry standardů.

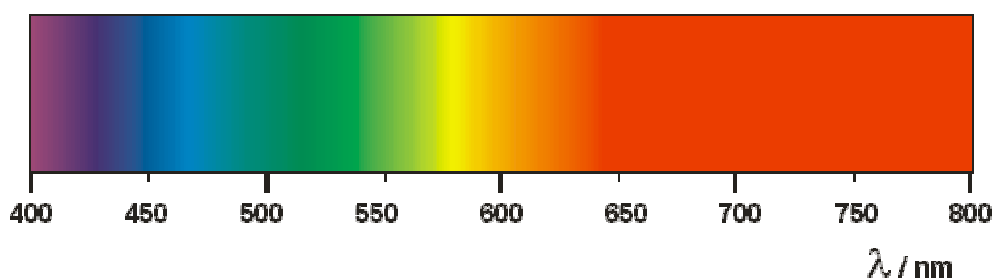
Ozga a kol.[70] identifikovali a kvantifikovali kyanidin-3-galaktosid, kyanidin-3-glukosid, kyanidin-3-arabinosid a kyanidin-3-xylosid v kultivarech pomocí HPLC s fluorescenční detekcí. K analýze byl použit extrakt v extrakčním činidle obsahující aceton:methanol:vodu: mravenčí kyselinu v poměru 40:20:20:0,1. Separace byla prováděna na koloně Zorbax SB-C18 koloně (250 mm x 4,6 mm), byla použita gradientová eluce za použití mobilní fáze obsahující rozpouštědlo A (5% kyselina mravenčí) a rozpouštědlo B (methanol). Kvantifikace anthokyanů byla provedena srovnáním s kalibračními křivkami standardů a identifikace anthokyanů srovnáním s UV-VIS spektry standardů.

Hu a kol.[71] identifikovali a kvantifikovali kyanidin-3-galaktosid, kyanidin-3-glukosid v kultivarech Thiessen a Smoky pomocí HPLC s UV detekcí. K analýze byl použit extrakt plodů s 80% ethanolem, 0,3% kyselinou methafosforečnou a 0,8% kyselinou octovou. Separace probíhala na koloně Phenomenex Luna C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 mm). Mobilní fáze obsahovala rozpouštědlo A (methanol) a B (5% kyselinu mravenčí) byla použita gradientová eluce. Průtok mobilní fáze byl nastaven 1,2 ml/min. Kvantifikace anthokyanů byla provedena srovnáním s kalibračními křivkami standardů a identifikace anthokyanů srovnáním s UV-VIS spektry standardů.

2.4.4 Stanovení barevných charakteristik v systému CIE L*a*b*

Barva a vznik barevného vjemu

Fyzikálně je barva charakteristikou viditelného záření pomocí níž je pozorovatel schopný rozlišit rozdíly mezi dvěma předměty stejných rozměrů a tvarů. Barva je definována jako vjem, jehož výsledný barevný efekt zprostředkovává lidské oko pozorováním předmětu, na který dopadá elektromagnetické záření o vlnové délce 380–760 nm (viditelná část spektra). Spektrum viditelného světla postupně přechází od fialové přes modrou, zelenou, žlutou až do červené barvy (*Obr. 18*). Skládáním vln různých frekvencí viditelného záření dochází k mísení barev. Vzájemným mísením základních monochromatických barev vznikají různé odstíny polychromatických barev. Na vzniku barevného vjemu se nepodílí pouze lidské oko, ale velmi důležitou úlohu hraje také dopadající světlo a vlastnosti pozorovaného předmětu. Barvu lze objektivně popsat pomocí tří vlastností: barevný tón (odlišuje barvy navzájem od sebe), sytost (označuje čistotu barvy, vzdálenost od neutrální šedé) a jas (světlost) [114, 115].



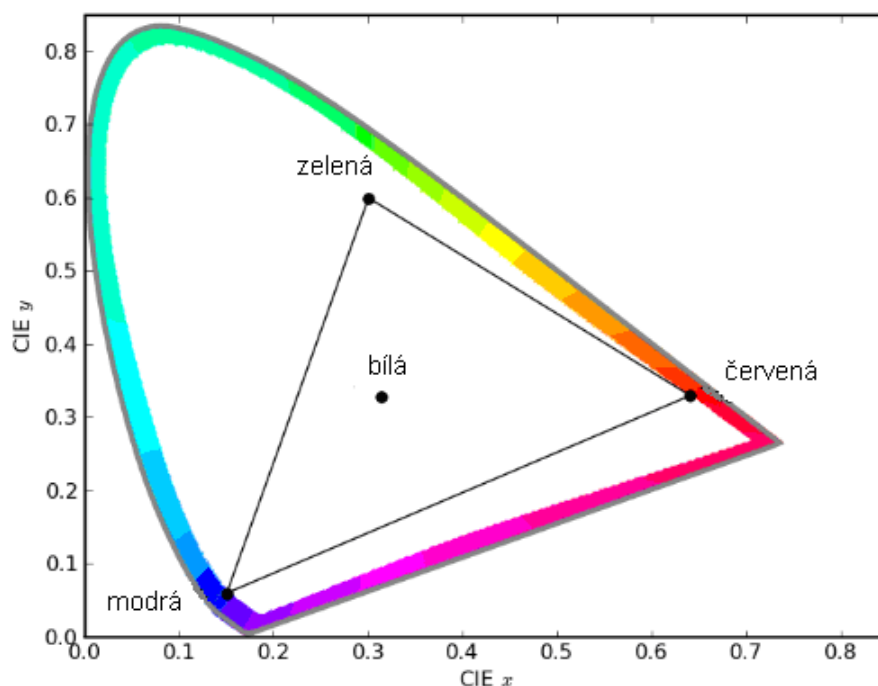
Obr. 18: Viditelné spektrum (elektromagnetické záření v rozmezí $\lambda = 380\text{--}760\text{ nm}$) [116]

Barevné systémy

Barevné systémy se používají pro zjednodušení záznamu barevné informace. Barevné modely definují soubor základních barev, pravidla pro jejich míchání a barevné charakteristiky. Existuje velké množství barevných systémů, které umožňují kvantifikaci barevného vjemu, např. RGB, CMYK, HSV, HSB, HLS, NCS, Munsellův model, Oswaldův model, CIE a YUV. V této diplomové práci byl ke zjištění barevných charakteristik využit barevný systém CIE Lab s využitím instrumentální techniky UV-VIS-NIR spektroskopie [115, 117].

CIE systém

CIE systém je barevný systém vytvořený organizací CIE (Commission Internationale d'Eclairage) v roce 1931. CIE systém umožňuje vyjádřit každou barvu pomocí tří čísel, tzv. trichromatických složek X , Y , Z , pokud jsou definovány standardní zdroje, podmínky osvětlení a pozorování. Složky X , Y , Z jsou základem CIE trichromatického prostoru XYZ a ve zjednodušené interpretaci lze považovat X za míru červené barvy, Y za míru zelené barvy a Z za míru modré barvy. Pro zjednodušení se přechází z vyjadřování barvy pomocí trichromatických složek na vyjádření pomocí trichromatických souřadnic x , y , z . Souřadnice x a y mohou sloužit na zobrazení odstínu v plošném diagramu CIE. Diagram CIE (Obr. 19) je trojúhelník se zaobleným okrajem a mírně zakřivenými rameny. Jeho základnu tvoří přímka, na níž leží souřadnice purpurových nespektrálních barev. Na obvodě barevného trojúhelníku leží všechny čisté barvy viditelného spektra. Bodu nepřesnosti odpovídají souřadnice přímého standardu pro použité světlo. Pokud chceme vyjádřit konkrétněji barvu, používá se vyjádření pomocí Helmholtzových souřadnic. První souřadnicí je dominantní vlnová délka λ_D , druhou souřadnicí je excitační čistota spektrální barvy p_E a třetí souřadnicí hodnota Y . Největším problémem tohoto systému je, že neposkytuje přímý způsob pro vyjádření procentuálních rozdílů mezi barvami. K přesnějšímu vyjádření barevného prostoru se CIE přiblížila v barevném modelu CIE $L^*u^*v^*$ a CIE $L^*a^*b^*$ [115, 117].



Obr. 19: Diagram CIE 1931 [118]

CIE $L^*a^*b^*$ systém

Barevný model CIE $L^*a^*b^*$ je založen na lidském vnímání barev. Číselné hodnoty v modelu CIE $L^*a^*b^*$ popisují všechny barvy, které člověk s normálním zrakem vidí. CIE $L^*a^*b^*$ je považován za barevný model nezávislý na zařízení. Popisuje barvy pomocí jejich luminance neboli složky světlosti, tmavosti L (pokud je $L = 100$ barva je světlá, pokud $L = 0$ barva je tmavá) a dvou chromatických složek: složky a (pokud je záporná ukazuje směr k zelené barvě, pokud kladná směr k červené barvě) a složky b (pokud je záporná ukazuje směr k modré barvě a pokud kladná směr k žluté barvě). Výhodou tohoto barevného prostoru

je součastné umístění vzorku a standardu, přičemž mezi nimi lze vyjádřit číselnou barevnou diferencí, která umožňuje na základě číselného intervalu vyjádřit číselnou shodu případně neshodu mezi vzorkem a standardem [115, 119].

2.4.5 Stanovení koncentrace vitamínu C

Metody pro izolaci vitamínu C

Vitamin C je velmi nestabilní a snadno podléhá oxidaci a hydrolýze, proto je nutné při jeho extrakci postupovat opatrně a zabránit jeho ztrátám. Vitamin C je stabilní v roztocích s nízkým pH (nejlépe pH = 2,1), proto se často používají k jeho extrakci roztoky kyselin, hlavně kyselina metafosforečná, trichloroctová, šťavelová, nebo často jejich kombinace s nízkomolekulárními alkoholy (methanol, ethanol). Bylo vypracováno několik doporučení pro extrakci vitamínu C ze vzorku, např. okyselení vzorku ihned po extrakci, přidavek antioxidantů (glutathion), chelatačních činidel (EDTA-ethylendiamintetraoctová kyselina), odstranění plynu probubláváním vzorku inertním plynem, přidavek redukujících sloučenin (homocystein), uchovávání vzorku v tmavých lahvích za nepřístupu denního světla, extrakce za nízkých teplot, za použití vychlazených roztoků, aby se zabránilo oxidaci a degradaci vitamínu C [120–122].

Metody pro stanovení vitamínu C

Vitamin C se vyskytuje v přírodě ve dvou formách, z 95 % jako kyselina L-askorbová (AA–Ascorbic Acid) a z 5 % jako kyselina dehydroaskorbová (DHAA–Dehydroascorbic Acid). Při jeho stanovení proto musí být brán zřetel na to, zda se stanovuje kyselina askorbová zároveň s kyselinou dehydroaskorbovou, anebo jde o stanovení AA a DHAA zvlášť vedle sebe z rozdílu stanovení před a po redukci.

Existuje velké množství metod pro stanovení vitamínu C a jeho forem. Nejčastěji používané metody lze rozdělit do několika skupin na metody: titrační, spektrometrické (UV-VIS spektrometrie, fluorimetrie, chemiluminiscenční metody), enzymatické, elektrochemické (voltarimetrie, coulometrie, polarografie) a chromatografické (HPLC a GC–Gas Chromatography). Chromatografické metody mají výhodu hlavně ve vysoké citlivosti stanovení [120, 121].

Nejčastěji používaná chromatografická metoda ke stanovení vitamínu C je HPLC, k detekci se může použít UV, fluorescenční, elektrochemická i hmotnostní detekce. V této diplomové práci byla použita pro stanovení kyseliny askorbové metoda HPLC s UV detekcí [121, 123].

Stanovení vitamínu C pomocí HPLC

Při stanovení vitamínu C pomocí HPLC s UV detekcí je nutné redukovat kyselinu dehydroaskorbovou na askorbovou kyselinu. První krok zahrnuje stanovení samotné AA, následně je proveden redukční krok a je stanoveno celkové množství vitamínu C. Množství kyseliny dehydroaskorbové poté lze zjistit odečtením koncentrace AA od celkové koncentrace vitamínu C. Konverze DHAA na AA se provádí pomocí dithiothreitolu, L-cysteinu nebo TCEP (tris(2-karboxyethyl)fosfinu) [121, 123].

Pro stanovení AA a DHAA se používá RP-HPLC. Jako stacionární fáze se používá silikagel s navázanými oktadecylovými skupinami. Mobilní fází je nejčastěji voda (někdy i

100%) s obsahem anorganické nebo organické kyseliny nebo anorganického pufru. Mobilní fáze musí mít nízké pH, aby neutrální formy kyseliny byly udržovány ve stacionární fázi, a také nižší hodnotu pKa než kyselina askorbová (pKa 4,17). Běžně se používá kyselina chloristá, trifluorooctová, sírová nebo fosforečná při hodnotách pH 2. Jedna z hlavních nevýhod je použití až 100% koncentrace vody v mobilní fázi, protože mobilní fáze bez organických modifikátorů mohou negativně ovlivnit účinnost separace kolony. Další nevýhodou je použití nízkého pH, které může urychlit degradaci kolony na bázi silikagelu. Tento problém je však možné vyřešit prenasycením kolony nebo změnou oxidu křemičitého za oxid zirkoničitý nebo polymer, který má zvýšenou stabilitu [121].

Stanovení vitamínu C v aronii

Ochmian a kol. [113] kvantifikovali obsah kyseliny askorbové v plodech *Aronia melanocarpa* pocházejících z experimentální stanice v Rajkovo pomocí RQflex 10 rekvantometru (Merck), přičemž její hodnota dosáhla 31 mg kyseliny/100 g ovocné šťávy.

Benvenuti a kol.[13] kvantifikovali obsah redukované kyseliny askorbové na $13,1 \pm 0,5$ mg/100 g čerstvých plodů pomocí HPLC-DAD. Vzorek k analýze byl připraven tak, že 5 g ovoce bylo extrahováno v 10 ml vody a poté centrifugováno 20 minut při 3 000 ot/min a poté přefiltrováno pomocí 0,45 μ m celulosového filtru do 25 ml odměrné baňky. Separace probíhala na Lichrospher RP-18 koloně (125 mm x 4 mm, 5 μ m). Mobilní fáze byla 5 mmol/dm³ vodný roztok oktaaminalicylatu (pH 6,3). Rychlost toku mobilní fáze byla 1 ml/min. Redukovaná kyselina askorbová byla identifikována srovnáním retenčního času a UV spektra se standardem, koncentrace AA byla zjištěna z kalibrační křivky standardního roztoku.

Stanovení vitamínu C v muchovníku

Kuříkova a kol.[66] kvantifikovali v kultivarech Thiessen, Smoky, Tišnovský a Brněnský obsah kyseliny askorbové pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí. Vzorek k analýze byl připraven tak, že 5 g plodů bylo extrahováno v extrakčním činidle obsahujícím methanol, vodu a kyselinu fosforečnou v poměru 99:0,5:0,5. Extrakce probíhala ve vodní lázni při teplotě 25 °C 15 minut. Extrakt byl přefiltrován přes filtrační papír Filtrapak No. 390 a poté byl filtrát opět přefiltrován pomocí membránového filtru a nastříknut do HPLC systému. Separace probíhala na koloně (Model Supelcosil LC8 (150 mm x 4,6 mm) při 30 °C. Mobilní fáze byla směs o složení methanol: voda: kyselina fosforečná (99:0,5:0,5). Byla použita isokratická eluce a rychlost toku mobilní fáze byla nastavena na 1,1 ml/min.

2.4.6 Metody vhodné pro stanovení antioxidační aktivity

V literatuře lze nalézt velké množství metod používaných ke stanovení antioxidační aktivity. Jejich rozmanitost vyplývá z faktu, že nízkomolekulární antioxidanty mohou působit různými mechanismy. Nejčastěji se jedná o přímou reakci s radikály nebo reakci s přechodnými kovy. Postupy hodnotící míru antioxidačního působení jsou založené na různých principech. Obecně mohou být rozděleny do dvou skupin – na metody hodnotící schopnost eliminovat radikály a na metody posuzující redoxní vlastnosti látek, přitom se využívá hlavně EPR, UV-VIS spektrometrie a HPLC [112, 124].

V následujícím přehledu jsou uvedeny jen základní metody pro stanovení antioxidační aktivity s důrazem převážně na metody používané v této diplomové práci.

Metody založené na eliminaci radikálů

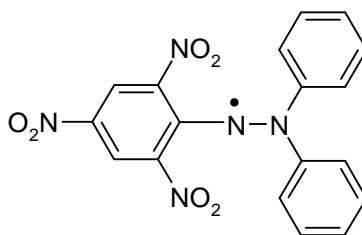
Metody jsou založené na schopnosti vzorku vychytávat volné radikály. Radikály mohou být v reakční směsi generovány přímo (např. chemickou reakcí nebo termicky), nebo do reakční směsi přidávány. Z chemického hlediska se jedná o syntetické stabilní radikály nebo o radikály kyslíkové [124].

U metod založených na eliminaci syntetických radikálů se používají nejčastěji stabilní syntetické radikály: \cdot DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl), ABTS $^{++}$ (2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzthiazol)-6-sulfonát, TEMPOL (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl), DMPD $^{+}$ (N,N-dimethyl-p-fenylendiamin), galvinoxyl, Fremova sůl a ke stanovení antioxidační aktivity se využívá instrumentálních technik EPR nebo UV-VIS spektrometrie, s ohledem na to, že většina radikálů jsou látky barevné a při jejich redukci dochází ke změně barvy, což je možné zaznamenat pomocí měření spekter ve viditelné oblasti.

Do metod založených na eliminaci kyslíkových radikálů, tedy schopnosti vychytávat peroxylové, hydroxylové, superoxidové-anion radikály, se řadí velké množství metod: metoda ORAC, metody založené na vychytávání $\text{OH}\cdot$ radikálů, $\text{O}_2\cdot^-$ radikálů, singletového kyslíku, H_2O_2 , metoda pro stanovení kyseliny chlorné, metoda měřící blednutí β -karotenu nebo metoda založená na použití krocinu [102, 112].

Metoda používající \cdot DPPH

Metoda je považována za jednu ze základních a nejstarších metodik pro posouzení antioxidační aktivity čistých látek i různých směsných roztoků. Poprvé použil tuto metodu Marsden Blois v roce 1958. Jedná se o rychlou, jednoduchou, levnou a široce používanou metodu pro posouzení celkové antioxidační aktivity potravin (TAA–Total antioxidant activity). Metoda je založena na reakci testované látky se stabilním volným radikálem \cdot DPPH, při níž dochází k redukci radikálu za vzniku difenylpykrilhydrazinu (DPPH-H). \cdot DPPH (Obr. 20) je volný radikál s charakteristickým tmavě fialovým zbarvením, které je dáno strukturou molekuly, která obsahuje delokalizovaný systém elektronů, který kromě barvy také celkově stabilizuje molekulu. Při reakci radikálu s testovanou látkou dochází k redukci radikálu a ke změně barvy roztoku z fialové až na světle žlutou. Rychlost a míra odbarvení jsou úměrné antioxidační aktivitě vzorku. Nejčastěji je reakce pozorována spektrometricky při 517 nm. Výjimečně je možné použít pro sledování změn koncentrace \cdot DPPH i pás při 330 nm. Účinnost antioxidantu lze vyjádřit jako hodnotu EC_{50} , určující koncentraci substrátu, která způsobuje 50% pokles absorbance (aktivity \cdot DPPH). Reakci lze sledovat i metodou EPR nebo HPLC. Detekce za použití HPLC je výhodná u barevných vzorků, které by mohly rušit spektrometrické stanovení. Aktivita směsných vzorků se někdy vztahuje na aktivitu kyseliny askorbové nebo Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylovou kyselinu) [102, 112, 124, 125].

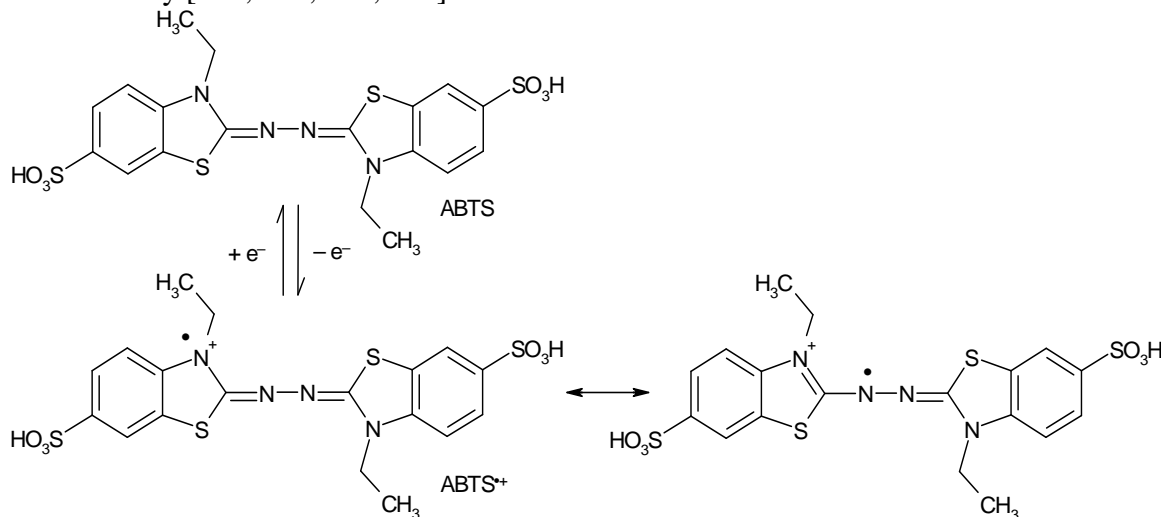


Obr. 20: Stabilní radikál \cdot DPPH [112]

\cdot DPPH test byl navržen ve dvou provedeních, dynamickém a statickém. V prvním provedení se měří rychlost úbytku \cdot DPPH pozorovaná po přidání vzorku obsahujícího fenolické látky. Ve statickém provedení se stanovuje množství vychytaného \cdot DPPH testovaným vzorkem. Zatímco dynamický test charakterizuje reaktivitu, statický určuje stechiometrii reakce \cdot DPPH s donorem H-atomů nebo množství aktivních OH-skupin v komplexní směsi. V dynamickém provedení je reaktivita charakterizována jako počáteční rychlost rozkladu \cdot DPPH [102, 124].

Metoda používající $ABTS^{*+}$

Metoda TEAC (TEAC–Trolox equivalent antioxidant capacity) je jednou ze základních a nejpoužívanějších metod pro stanovení celkové TAA. Byla navržena Millerem, Rice-Evans Davisem, Copinathanem a Milnerem v roce 1993 pro testování biologických vzorků. Metoda je založená na zhášení syntetického stabilního kation radikálu $ABTS^{*+}$. $ABTS^{*+}$ má výraznou modrozelenou barvu, v přítomnosti látek s antioxidačními účinky se redukuje a odbarvuje. Výsledná antioxidační aktivita je srovnávána se standardní látkou Troloxem, což je ve vodě rozpustný derivát vitamínu E. V reakční směsi se kation-radikál $ABTS^{*+}$ generuje oxidací ABTS (Obr. 21). Převážně se používá systém ABTS/ H_2O_2 /peroxidasa nebo ABTS/methmyoglobin/ H_2O_2 . Je však možná i chemická oxidace pomocí anorganických oxidačních činidel, např. peroxodisíranu draselného nebo oxidu manganického. $ABTS^{*+}$ má silný absorpční pás v rozsahu vlnových délek 600–750 nm, proto se zhášení $ABTS^{*+}$ sleduje spektrofotometricky, nejčastěji se měří absorbance při maximu pásu, 734 nm (pro vodné roztoky) nebo se reakce pozoruje s využitím EPR. Tato metoda je levná a snadno použitelná, rychlá, má široké uplatnění od hodnocení antioxidační aktivity látek různého původu až po směsné vzorky [112, 124, 126, 127].



Obr. 21: Struktura ABTS a $ABTS^{*+}$ [128]

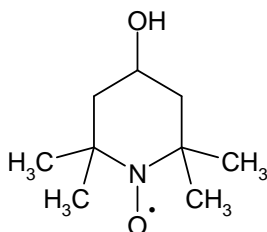
Metoda používající $DMPD^{*+}$

Nová metoda, podobná metodě $ABTS^{*+}$, je měření s pomocí DMPD. V přítomnosti vhodného oxidačního roztoku o kyselém pH (např. peroxodisíranu draselného) se DMPD mění na stabilní a barevný DMPD kation-radikál ($DMPD^{*+}$). Antioxidanty schopné přenosu vodíkových atomů na radikál způsobují odbarvení roztoku, které je měřitelné spektrofotometricky při 505 nm nebo lze reakci pozorovat pomocí EPR. Účinnost antioxidantu se vyjádří jako Trolox ekvivalent. Přítomnost organických kyselin (kyseliny

citronové) může rušit působení DMPD, proto u extraktů bohatých na organické kyseliny by tato metoda měla být volena s opatrností. Metoda je oproti ABTS^{•+} metodě jednodušší, produktivnější a méně nákladná [91, 92, 102, 129].

Metoda používající TEMPOL

Dalším používaným syntetickým radikálem je TEMPOL (Obr. 22), který je stabilní a dobře rozpustný ve vodě. V redukovaném stavu může odevzdávat elektron superoxidovému anion radikálu za vzniku peroxidu vodíku. TEMPOL je inhibitor oxidací katalyzovaných kovy. Oxiduje železnaté ionty na železitou formu, a proto zabraňuje reakci železnatých iontů s peroxidy, je schopný zhaset superoxidový anion radikál nebo hydroxylový radikál. TEMPOL je často využíván jako spinová značka ve kvantitativní EPR spektrometrii [130–132].



Obr. 22: Radikál TEMPOL [100]

Metoda ORAC

Při použití metody ORAC se v testovaném systému generují kyslíkové radikály a hodnotí se schopnost testované látky zpomalit nebo zastavit radikálovou reakci. Detekce je založena na sledování úbytku rychlosti poklesu fluorescence β -fykoerytrinu, způsobená antioxidantem. β -fykoerytrin však má omezení při stanovení antioxidační aktivity polyfenolů, vzhledem k jeho nižší fotostabilitě. Vhodnější v takové situaci je použití stabilnějších a méně reaktivních činidel jako je např. fluorescein nebo dichlorofluorescein. Ke generaci peroxylových radikálů se používá činidlo AAPH (2,2'-azobis-(2-amidinopropan-dihydrochlorid)). Pokud se test provádí s využitím hydroxylových radikálů, ty jsou pak generovány systémem H_2O_2/Cu^{2+} . Metodu ORAC lze použít ke stanovení jak hydrofilních antioxidantů (H-ORAC), tak i lipofilních antioxidantů (L-ORAC). Stanovení hydrofilních antioxidantů je založeno na výše uvedeném principu. Při stanovení lipofilních antioxidantů je třeba použít vhodné extrakční činidlo k extrakci lipofilních složek vzorku. Ke stanovení lze použít BODIPY 581/591 nebo BODIPY 665/676 jako fluorescentní sondu a AMVN (2,2'-azobis-2,4-dimethylvaleronitril) jako lipofilní iniciátor peroxylových radikálů. BODIPY jsou skupinou fluorescentních barviv, skládají se z komplexu dipyromethenu se substituovaným atomem boru [86, 126, 132–135].

Metody používané na hodnocení redoxních vlastností látek

Neenzymové antioxidanty jsou redukční činidla, která mohou redukovat radikály, a tím je inaktivovat. Proto se aktivita antioxidantů dá odhadnout i podle jejich redoxních vlastností. Řadíme sem hlavně metodu FRAP (Ferric reducing antioxidant potential), CUPRAC (Cupric ion reducing antioxidant capacity) a fosfomolybdenovou metodu [124].

Metoda FRAP

Metoda FRAP je založena na redukci železitého komplexu Fe^{3+} -2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazin) (Fe^{3+} -TPTZ) antioxidanty přítomnými v systému na intenzivně modře zbarvenou železnatou formu Fe^{2+} -TPTZ. Nárůst absorbance při 593 nm, který odpovídá množství komplexu Fe^{2+} -TPTZ, je mírou antioxidační aktivity studovaného systému. Reakci lze sledovat spektrofotometricky. Nevýhodou této metody je, že stanovení probíhá při nefyziologické hodnotě pH (3,6), komplex nezachycuje pomalu reagující látky (polyfenoly, thioly) a navíc Fe^{2+} je jedním z produktů Fentonovy reakce [112, 124].

Metody hodnotící eliminaci lipidové peroxidace

Rozsah lipidové peroxidace může být stanoven řadou metod, které lze rozdělit na ty, které měří primární produkty lipidové peroxidace, jako hydroperoxy, a ty, které měří sekundární štěpné produkty hydroperoxidů, jako jsou malondialdehyd, 4-hydroxy-nonenal a těžké uhlovodíky. Může být použito velké množství metod: thiokyanátová metoda, stanovení uvolněného jódu, metoda rancimat, stanovení hydroperoxidů lipidů, konjugovaných dienu, uhlovodíků a cytotoxických uhlovodíků, stanovení TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances), metoda LPO-586 nebo stanovení hexanalů a příbuzných konečných produktů [112, 129].

Stanovení antioxidační aktivity v plodech aronie

Benvenuti a kol.[13] stanovili antioxidační aktivitu v odrůdě Nero metodou DPPH^{\bullet} za použití Lambda 5 UV-VIS spektrometru jako hodnotu EC_{50} na úrovni $1,8 \pm 0,3$ mg. K analýze byl použit extrakt z aronie v methanolu s 2% HCl.

Oszmiański a Wojdylo [15] stanovili antioxidační aktivitu v aronii metodou DPPH pomocí UV-VIS spektrometrie na 279,38 mg/100 g sušiny. Vzorek byl připraven tak, že 1 g lyofilizovaných plodů byl homogenizován ve 20 ml methanolu, přefiltrován a zředěn methanolem.

Oszmiański a Wojdylo [15] určili antioxidační aktivitu v aronii metodou TEAC pomocí UV-VIS spektrometrie na $439,49 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ Troloxu/100 g sušiny. K analýze byl použit methanolvý extrakt z aronie.

Jakobek a kol. [12] zjistili TAA metodou DPPH^{\bullet} v aronii $181,07 \mu\text{mol TE/g}$. K analýze byl použit methanolvý extrakt aronie. Jakobek a kol.[12] také určili TAA $78,90 \mu\text{mol TE/g}$ vyjádřenou metodou TEAC pomocí $\text{ABTS}^{\bullet+}$ testu.

Jakobek a kol. v nové studii [16] zjistili TAA u odrůd Nero, Viking, Galicianka a divoké aronie metodou DPPH^{\bullet} i $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Na měření byl použit odpařený ethanolový extrakt aronie.

Kuzmanova a kol.[136] použili EPR k potvrzení, že extrakty *Aronia melanocarpa* o různých koncentracích vykazují antioxidační aktivitu. EPR experimenty probíhaly na přístroji Varian E-109. Spektrometrické parametry byly nastaveny na: frekvenci 9,27 GHz, střed pole 8 mT, mikrovlnný výkon 4,9 mW a modulační amplitudu 0,11 mT. Stabilita čerstvě připraveného ethanolového roztoku aronie (0,1, 0,2, 0,5 a 1%) byla měřena po dobu 30 minut a nebyla zaznamenána žádná výrazná ztráta signálu. Ztráty signálu na úrovni 7 % počáteční intenzity bylo dosaženo až po 24 hodinách.

Stanovení antioxidační aktivity v plodech muchovníku

Rop a kol.[67] kvantifikovali TAA v devíti kultivarech muchovníku. Ke stanovení TAA použili DPPH a ABTS^{•+} test za použití UV-VIS spektrofotometrie. K analýze byl použit methanolický extrakt plodů muchovníku. Největší hodnotu TAA vykazoval v obou testech kultivar Tišnovský.

Bakowska a kol.[87] kvantifikovali TAA pomocí identických testů u sedmnácti kultivarů muchovníku. Byla měřena TAA čerstvých plodů a plodů po 9 měsících skladování při -20 °C. K analýze byl použit mírně okyselený methanolický extrakt plodů muchovníku.

Hu a kol. [71] kvantifikovali spektrofotometricky TAA v odrůdách Thiessen a Smoky. Kultivar Thiessen vykazoval vyšší hodnoty TAA v obou testech. K analýze byl použit extrakt plodů s 80% ethanolem, 0,3% kyselinou metafosforečnou a 0,8% kyselinou octovou.

2.5 Statistické metody

V diplomové práci byla ke statistickému zhodnocení výsledků použita metoda ANOVA Tukey HSD, a také metody vícerozměrné statistiky, zejména metoda hlavních komponent a diskriminační statistické metody (kanonická diskriminační analýza a metoda k-tého nejbližšího souseda).

ANOVA (Analysis of Variance) umožňuje provádět vícenásobné porovnávání středních hodnot, je založena na hodnocení vztahů mezi rozptyly porovnávaných výběrových souborů a analyzuje účinek jednoho faktoru na zkoumanou závislou proměnnou [88].

Pro znázornění a určení vzájemných vztahů více parametrů u většího souboru analyzovaných vzorků se efektivně využívají metody vícerozměrné statistiky. V práci byly využity zejména metoda hlavních komponent, faktorová analýza a vybrané metody diskriminační analýzy.

Metoda hlavních komponent (PCA–Principal Component Analysis) se využívá při analýze skrytých vztahů mezi proměnnými tak, že se transformuje velký počet potenciálně korelujících experimentálně zjištěných parametrů na menší počet vzájemně nekorelujících hlavních komponent lineární kombinací parametrů. Hlavní komponenty jsou konstruovány tak, že první komponenta popisuje maximum variability studovaného systému a každá další komponenta maximum zbývající variability. Z analýzy získaných statistických údajů je možné posoudit, které experimentální charakteristiky jakou váhou přispívají k popisu variability celého systému, tj. nejlépe vystihují vlastnosti celého souboru dat [88, 137].

Faktorová analýza poskytuje informace o vzájemné korelaci parametrů. Pomocí faktorové analýzy (v práci se využívá ortogonální rotace Varimax) byla posouzena schopnost jednotlivých proměnných vzájemně korelovat, což je důležité z hlediska následného využití takové proměnné pro účely diferenciací vzorků. Rotace Varimax je pravouhlá rotace realizovaná tak, aby byla maximalizovaná variance druhých mocnin všech hodnot proměnných (parametrů) pro všechny vzorky. Tento postup umožňuje popsat každou proměnnou (sledovanou experimentální charakteristiku) jediným vektorem. Vektory jsou navzájem pravouhlé, tj. není mezi nimi žádná korelace [138].

Diskriminační analýza zkoumá zákonitosti v rozdělení do skupin a formuluje pravidlo, diskriminační funkci, které umožní zařadit zkoumaný-posuzovaný objekt do konkrétní skupiny. Kanonická diskriminační analýza hledá a vypočítává diskriminační funkce a bere do úvahy všechny nezávislé proměnné [88, 139].

Metoda k-tého nejbližšího souseda zařazuje vzorky do skupin na základě srovnání vlastností klasifikovaného objektu a *k* nejbližších už klasifikovaných objektů (běžně se volí

1.–3. nejbližší objekt–soused). Jedná se o neparametrický test, ve kterém je pravděpodobnost, že klasifikovaný objekt patří do některé skupiny, posuzovaná na základě výpočtu vzdálenosti k -tého nejbližšího souseda od těžiště celé skupiny (centroidu). Tímto způsobem se efektivně eliminují vlivy odlehlých hodnot. Počet sousedů k je definovaný uživatelem, běžně $k = 1, 2$ nebo 3 . Čím vyšší je počet srovnávaných objektů (čím je vyšší k), tím je zpravidla vyšší variabilita a nižší klasifikační skóre [139].

3 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

S ohledem na experimentální možnosti pracoviště Výzkumného ústavu potravinářského v Bratislavě, cílem předložené diplomové práce bylo sledování vybraných fyzikálně-chemických a nutričních parametrů vybraných odrůd *Aronia melanocarpa* a *Amelanchier alnifolia* pomocí spektroskopických a chromatografických technik, zejména EPR, UV-VIS a HPLC, s důrazem na vliv rozpuštědla na sledované parametry. Posuzoval se také vliv odrůdy a roku produkce na sledované parametry v jednotlivých rozpouštědlech. Za tímto účelem byly v práci vhodně využity vybrané statistické metody.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Pro komplexní charakterizaci plodů aronie a muchovníku byly sledovány následující parametry: celková koncentrace polyfenolických látek (TPC) a anthokyanů (TAC), schopnost vzorků redukovat Fe^{3+} ionty (FRAP) a barevné charakteristiky v systému CIE $L^*a^*b^*$, které byly stanoveny pomocí UV-VIS-NIR spektroskopie. Obsah kyseliny askorbové byl stanoven pomocí HPLC-DAD. Radikál-zhášecí aktivita oproti radikálům $^{\bullet}DPPH$ a $ABTS^{\bullet+}$ byla monitorována pomocí EPR spektroskopie.

Veškeré experimenty byly realizovány na pracovišti Oddělení chemie a analýzy potravin Výzkumného ústavu potravinářského v Bratislavě ve dvou paralelních pokusech každý o dvou opakováních.

4.1 Analyzované vzorky

K analýze byly použity dvě odrůdy *Aronia melanocarpa* a čtyři odrůdy *Amelanchier alnifolia*, které byly sesbírány v průběhu let 2012 a 2013 (Tabulka 9). Vzorky pochází z genofondových ploch Mendelovy univerzity v Brně, které se nacházejí v Žabčicích u Brna.

Lokalita je charakteristická hlinitou, nivní půdou s výrazným gleovým efektem [140]. V roce 2012 zde byla zaznamenána průměrná roční teplota $10,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ a množství srážek $431,6\text{ mm}$ a v roce 2013 roční teplota $11,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ a množství srážek $535,7\text{ mm}$. Plody byly sbírány v plné konzumní zralosti. Zralost byla určena podle konzistence a zbarvení plodů [141]. Plody byly sklizeny ve spolupráci s Ústavem šlechtění a množení zahradnických rostlin Zahradnické fakulty v Lednici. Z každé odrůdy bylo náhodně odebráno 100 g a následně byly plody zmrazeny při $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ a uchovávány při této teplotě do analýzy. V Příloze 1 a 2 je uveden přehled všech analyzovaných odrůd.

Tabulka 9: Přehled vzorků aronie a muchovníků

ID	Odrůdy <i>A. melanocarpa</i>	Datum sběru
AN12	Nero	8.8. 2012
AV12	Viking	8.8. 2012
AN13	Nero	3.9. 2013
AV13	Viking	3.9. 2013

ID	Odrůdy <i>A. alnifolia</i>	Datum sběru
MO12	Ostravský	23.6. 2012
MV12	Tišnovský velkoplodý	23.6. 2012
MT12	Thiessen	23.6. 2012
ML12	Lamarckii Balerina	23.6. 2012
MS13	Tišnovský školský	1.7. 2013
MV13	Tišnovský velkoplodý	1.7. 2013
MT13	Thiessen	1.7. 2013
ML13	Lamarckii Balerina	1.7. 2013

4.2 Laboratorní vybavení

Pomůcky:

- běžné laboratorní sklo Simax (Kavalier, ČR)
- skleněné vialky 5 ml a 50 ml s plastovým uzávěrem
- skleněné zkumavky s plastovým uzávěrem (Kavalier, ČR), stojan na zkumavky
- plastové centrifugační zkumavky s uzavíráním (Fisher, SK)
- automatické pipety 100 µl, 1000 µl, 5 ml a 10 ml (Eppendorf, USA), špičky
- křemenné kyvety 1 cm a 1 mm pro UV-VIS oblast (Helma, Německo)
- plochá křemenná kyveta pro EPR, vnitřní objem 500 µl (Bruker, Německo)
- teploměr, stříčky, nylonové mikrofiltry 0,45 µm (Chromservis, Česká republika)

Chemikálie:

- kyselina gallová (Merck, Německo)
- Folin-Ciocalteuovo činidlo (Microchem, SK)
- uhličitán sodný bezvodý p.a. (Slavus, SK)
- chlorid draselný (Merck, Německo)
- octan sodný (Fluka Chemika, Švýcarsko)
- standardní sada pufrů (Sigma Aldrich Ltd., Švýcarsko)
- kyselina chlorovodíková 36% (Merck, Německo)
- dihydrogenfosforečnan draselný (Merck, Německo)
- hydroxid sodný (Microchem, Slovensko)
- hexakynoželezitan draselný (Sigma Aldrich Ltd., Švýcarsko)
- trichloroctová kyselina p.a. (Merck, Německo)
- chlorid železitý p.a. (Merck, Německo)
- kyselina L-askorbová p.a. (Lachema, ČR)
- kyselina metafosforečná 33,5% (Fluka, Švýcarsko)
- ethanol (Merck, Německo)
- ortofosforečná kyselina 85% (Lachema, ČR)
- dimethylsulfoxid DMSO (Sigma Aldrich Ltd., Švýcarsko)
- deionizovaná voda (Rodem 6, průměrná vodivost do 1 µS·cm⁻¹)

- (2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzthiazol)-6-sulfonát – ABTS (Polysciences, VB)
- peroxidisíran draselný (Fluka, Švýcarsko)
- 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl – DPPH (Fluka, Švýcarsko)

Přístroje:

- lednička s mrazničkou (Electrolux, Švédsko)
- analytické váhy AP-100 (Ohaus, Švýcarsko)
- kuchyňský mixér (Tefal, Francie)
- laboratorní třepačka Innova 2000 Platform Shaker (New Brunswick Scientific, USA)
- laboratorní centrifuga s možností chlazení 2-16 KC (Sigma, Německo)
- pH metr Hach (Hach, USA)
- UV-VIS-NIR spektrofotometr Schimadzu 3600 s příslušenstvím (Schimadzu, Japonsko)
- X-pásmový portable EPR spektrometr e-scan s příslušenstvím (Bruker, Německo)
- kapalinový chromatograf HPLC-DAD Agilent 1100 (Agilent Technologies, Německo)
- ultrazvuková lázeň (Kraintek, SK)

4.3 UV-VIS experimenty

Všechny UV-VIS experimenty byly realizovány pomocí UV-VIS-NIR spektrofotometru Schimadzu 3600 s příslušenstvím.

4.3.1 Příprava extraktů pro UV-VIS experimenty

Přibližně 10 g zmražených plodů bylo rozmixováno v mixeru s nerezovou miskou. Poté do plastové centrifugační zkumavky byly naváženy na analytických váhách přesně 3 g rozmixovaných plodů. K navážce bylo přidáno 25 ml rozpouštědla (50% ethanol, destilovaná voda, resp. DMSO). Směs byla hodinu třepána na třepačce a poté centrifugována při 15 000 ot/min 10 minut při 20°C. Supernatant byl opatrně slit do tmavé 50 ml vialky a uchováván v lednici do analýzy. Z každé odrůdy byly paralelně připraveny vždy dva extrakty.

4.3.2 Stanovení celkového obsahu polyfenolů

Celkový obsah polyfenolických látek byl stanoven modifikovanou metodou s využitím Folin-Ciocalteuova činidla podle Chaovanalikita a Wrolstada [142]. Do vialky bylo napipetováno 200 µl vzorku, 15,8 ml destilované vody a 1 ml Folin-Ciocalteuova činidla. Směs byla po promíchání ponechána 10 minut stát a poté byly přidány 3 ml 20% roztoku uhličitanu sodného. Směs byla opět promíchána a ponechána hodinu zreagovat. Po uplynutí této doby byla změřena absorbance při vlnové délce 765 nm oproti referenci (příslušné extrakční činidlo místo vzorku). Stejným postupem byla připravena kalibrační křivka s použitím standardních roztoků kyseliny gallové v koncentračním rozpětí 0–2 000 mg/l.

Celkový obsah polyfenolických látek byl zjištěn z kalibrační křivky kyseliny gallové v mg/l. Tato koncentrace byla přepočítána na původní navážku vzorku a vyjádřena jako GAE v g/kg.

4.3.3 Stanovení anthokyanů pH diferentní metodou

Celkový obsah anthokyanů v příslušném extraktu aronie resp. muhovníku byl zjištěn pomocí pH diferentní metody podle Guisti a Wrolstada [143]. Do čtyř zkumavek bylo napipetováno 500 µl extraktu (u aronie byl extrakt ředěn 5krát v případě použití destilované vody a 50% ethanolu, 10krát u DMSO). Poté bylo přidáno do dvou zkumavek 2,5 ml

0,025 mol/dm³ pufru chloridu draselného o pH 1 a do zbylých dvou zkumavek 2,5 ml 0,4 mol/dm³ pufru octanu sodného o pH 4,5. Směs byla důkladně promíchána, následně byla změřena absorbance takto připravených směsí při vlnové délce 510 nm a 700 nm. Jako blank bylo použito příslušné extrakční činidlo.

Z naměřených hodnot absorbancí byla vypočítána výsledná absorbance podle rovnice (12). Následně byla podle rovnice (13) vypočítána koncentrace monomerního pigmentu kyanidin-3-glukosidu v mg/l. Koncentrace monomerního pigmentu byla přepočtena na navážku původního vzorku a vyjádřena v mg/kg plodů.

Celková absorbance vzorků

$$A = (A_{510} - A_{700})_{pH1} - (A_{510} - A_{700})_{pH4,5} \quad (12)$$

Koncentrace monomerního pigmentu ve vzorku

$$c_{MP} = \frac{A \cdot M \cdot F \cdot 1000}{\varepsilon \cdot l} \quad (13)$$

kde c_{MP} je výsledná koncentrace monomerního pigmentu [mg/l], A je celková absorbance vzorku, M je molekulová hmotnost kyanidin-3-glukosidu, F je faktor ředění, ε je molární absorpční koeficient pro kyanidin-3-glukosid [dm³/mg·cm], l je tloušťka absorbující vrstvy [cm].

4.3.4 Stanovení barevných charakteristik v systému CIE L*a*b*

Do 1mm křemenné kyvety byl napipetován příslušný extrakt. Jako blank bylo použito odpovídající extrakční činidlo. Spektrum vzorku bylo snímáno při vlnové délce 200–1 000 nm v 0,5nm intervalu a šířkou štěrbiny 1 nm.

Pro vyhodnocení barevnosti byla využita viditelná oblast naměřených spekter od 380 do 780 nm, a vyhodnocení bylo realizováno v podmínkách 10° pozorovatel a standardní zdroj osvětlení Illuminant D65, který představuje denní světlo, teplota barvy tohoto zdroje je 6 500 K [107].

Pomocí softwaru Panorama Advanced Colorlite (Labcognition Schimatzu, Japonsko) byly vypočítány barevné deskriptory. Z množiny barevných ukazatelů byly pro účely objektivního hodnocení barevnosti a jejích změn vybrány trichromatické parametry systému CIE L*a*b* (L*- měrná světlost, a*- odstín mezi červenou a zelenou, b* - odstín mezi žlutou a modrou), chromaticita a úhel barevného odstínu (hue angle).

4.3.5 Stanovení schopnosti vzorku redukovat železo (metoda FRAP)

Schopnost extraktů aronie nebo muchovníků redukovat Fe³⁺ na Fe²⁺ byla testována metodou podle Chyau a kol. [144]. 2 ml extraktu byly smíchány s 2 ml 0,2 mol/dm³ sodno-fosfátového pufru (pH 6,6) a 2 ml 1% hexakvanoželezitanu draselného. Směs byla inkubována 20 minut ve vodní lázni o teplotě 50 ± 2 °C. Ke směsi byly následně přidány 2 ml 10% kyseliny trichloroctové a takto připravená směs byla centrifugována 10 min při 3 000 ot/min. Následně 500 µl supernatantu bylo smícháno s 2,5 ml destilované vody a 100 µl 0,1% chloridu železitého přímo v křemenné kyvetě a vše bylo důkladně promícháno. Absorbance směsi byla měřena při 700 nm po dobu 120 s.

Z naměřených dat byla zjištěna hodnota absorbance vzorku v čase 100 s, od níž byla odečtena hodnota absorbance reference.

4.4 HPLC experimenty

HPLC experimenty byly realizovány pomocí HPLC-DAD chromatografu Agilent 1100 s příslušenstvím.

4.4.1 Příprava extraktů pro HPLC experimenty

Přibližně 10 g zmražených plodů bylo rozmixováno. Do plastové centrifugační zkumavky byly naváženy na analytických vahách přesně 3 g rozmixovaných plodů, k navážce bylo přidáno 25 ml 2% roztoku kyseliny metafosforečné. Směs byla 5 minut třepána, následně 5 minut sonifikována a nakonec 5 minut centrifugována při 15 000 ot/min a teplotě 20°C. Supernatant byl opatrně slit do tmavé 50 ml vialky a přefiltrován přes mikrofiltr. U každé odrůdy byly paralelně připravovány dva extrakty. Připravený extrakt byl ihned aplikován na kolonu kapalinového chromatografu a analyzován.

4.4.2 Stanovení kyseliny askorbové

Stanovení kyseliny askorbové v plodech aronie a muchovníků bylo provedeno modifikovaným postupem podle Tobolkové a kol. [145]. Analyt byl sledován při vlnové délce 240 nm.

Parametry HPLC chromatografu:

předkolona:	Zorbax SB-C18 (12,5 × 4,6 mm, velikost částic 5 μm)
kolona:	Zorbax SB-C18 (12,5 × 4,6 mm, velikost částic 5 μm)
nástřik vzorku:	50 μl
mobilní fáze (MF):	0,01 mol/dm ³ roztok kyseliny fosforečné v deionizované vodě methanol (poměr 9:1) (MF A), methanol (MF B)
průtok mobilní fáze:	1,0 ml/min
detektor:	detektor s diodovým polem (DAD)
teplota kolony:	25 °C
celková doba analýzy:	20 minut
eluce:	gradientová

Vzhledem k charakteru plodů, které obsahují velké množství nepolárních složek (polyfenolické látky, anthokyanová barviva) byl zařazen při separaci gradient mobilní fáze (*Tabulka 10*), aby byly tyto složky z kolony vyeluovány a nezachycovaly se.

Tabulka 10: Použitý gradient mobilní fáze

čas analýzy	zastoupení A [%]	zastoupení B [%]
1–6 min	100	0
6–8 min	0	100
8–15 min	0	100
15–17 min	100	0
17–20 min	100	0

A– 0,01 mol/dm³ roztok kyseliny fosforečné : methanol (poměr 9:1); B– methanol

Pro vyhodnocení výsledků byl použit program Agilent ChemStation (Agilent Technologies, Německo), pomocí kterého byl zjištěn retenční čas, plocha píku a UV spektrum kyseliny askorbové ve standardech a vzorcích ovoce. Z kalibrační křivky, která byla sestavená ze standardů kyseliny askorbové ve 2% roztoku kyseliny metafosforečné v koncentračním rozpětí 1–100 mg/l, byla zjištěna koncentrace kyseliny askorbové ve vzorcích aronie a muchovníků. Tato koncentrace byla poté přepočtena na navážku původního vzorku a vyjádřena v mg/kg. Kyselina askorbová byla identifikována na základě překrytí spekter standardu se vzorky, dále na základě porovnání naměřených UV spekter s knihovnou .

4.5 EPR experimenty

Všechny EPR experimenty byly realizovány pomocí X-pásmového EPR spektrometru e-scan (Bruker, Německo) s příslušenstvím.

4.5.1 Příprava extraktů pro EPR experimenty

Extrakty byly připravovány stejným postupem jak je uvedeno v kapitole 4.3.1.

4.5.2 Stanovení radikál-zhášecí aktivity s využitím radikálů \cdot DPPH a $\text{ABTS}^{+\cdot}$

Radikál-zhášecí aktivita extraktů byla testována pomocí roztoku stabilního volného radikálu \cdot DPPH resp. kation radikálu $\text{ABTS}^{+\cdot}$, připraveného podle Re a kol.[146]. Přesně 300 μl příslušného extraktu, podle potřeby zředěného, bylo smícháno se 700 μl roztoku 0,1 mmol/l $\text{ABTS}^{+\cdot}$ ve vodě nebo 0,1 mmol/l roztoku \cdot DPPH v ethanolu. V případě referenčního systému bylo do reakční směsi místo vzorku přidáno příslušné extrakční činidlo. Směs příslušného radikálu a vzorku byla následně promíchána 2 ml vzduchu a umístěna do ploché EPR kyvety.

Parametry EPR analýzy

Všechna měření byla realizována pomocí ploché křemenné kyvety vhodné pro EPR měření. Kyveta s vnitřním objemem 500 μl byla opatřena injekční stříkačkou s objemem 2 ml pro ulehčení plnění měřeným vzorkem. Kyveta byla umístěna do dutiny EPR spektrometru a po nastavení parametrů měření se začal sledovat časový vývoj 10 EPR spekter během 15 min se začátkem přesně 3 min po přidavku příslušného radikálu (\cdot DPPH resp. $\text{ABTS}^{+\cdot}$) do systému.

Typické parametry EPR spektrometru:

střed pole	346,5 mT (\cdot DPPH)/346,2 mT($\text{ABTS}^{+\cdot}$)
šířka pole	10 mT
modulace	0,05 mT
zesílení	$3,99 \cdot 10^3$
výkon mikrovlnného záření	6 mW
frekvence mikrovlnného záření	9,71 GHz
časový rozdíl mezi spektry	$\Delta t = 15 \text{ min}$
časová konstanta	10,24 ms
délka 1 scanu	2,62s
počet scanu	30
počet snímaných spekter	10

Naměřená spektra byla zpracována v programech WinEPR (Bruker, Německo) a OriginPro v.7.0. (MicroCalc, USA). Radikál-zhášecí aktivita extraktů aronie resp. muchovníků oproti radikálům $\cdot\text{DPPH}$ a $\text{ABTS}^{\bullet+}$ byla vyjádřena jako hodnota TEAC, vypočítaná pro hodnoty koncentrace $\cdot\text{DPPH}/\text{ABTS}^{\bullet+}$ (dvojitý integrál EPR spektra) naměřené v čase 10,5 min po přidání daného radikálu do systému podle vztahu:

$$TEAC_{\cdot\text{DPPH}/\text{ABTS}} = \frac{(c_{0(\cdot\text{DPPH}/\text{ABTS}^{\bullet+})} - c_{t(\cdot\text{DPPH}/\text{ABTS}^{\bullet+})}) \cdot V_{(\cdot\text{DPPH}/\text{ABTS}^{\bullet+})}}{V_{\text{vzorku}}} \cdot \nu \cdot F \quad (14)$$

kde $c_{0(\cdot\text{DPPH}/\text{ABTS}^{\bullet+})}$ je počáteční koncentrace roztoku $\cdot\text{DPPH}$ ($\text{ABTS}^{\bullet+}$), $c_{t(\cdot\text{DPPH}/\text{ABTS}^{\bullet+})}$ je koncentrace roztoku $\cdot\text{DPPH}$ ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) po jejich přidavku do systému ve zvoleném čase t ($t = 10,5$ min), $V_{(\cdot\text{DPPH}/\text{ABTS}^{\bullet+})}$ je objem $\cdot\text{DPPH}$ ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) přidaného do systému, V_{vzorku} je objem vzorku přidaného do systému, ν je stechiometrický koeficient reakce $\cdot\text{DPPH}$ ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) a TROLOX (v obou případech, $\nu = 1/2$), F je faktor zředění.

4.6 Statistické zpracování výsledků

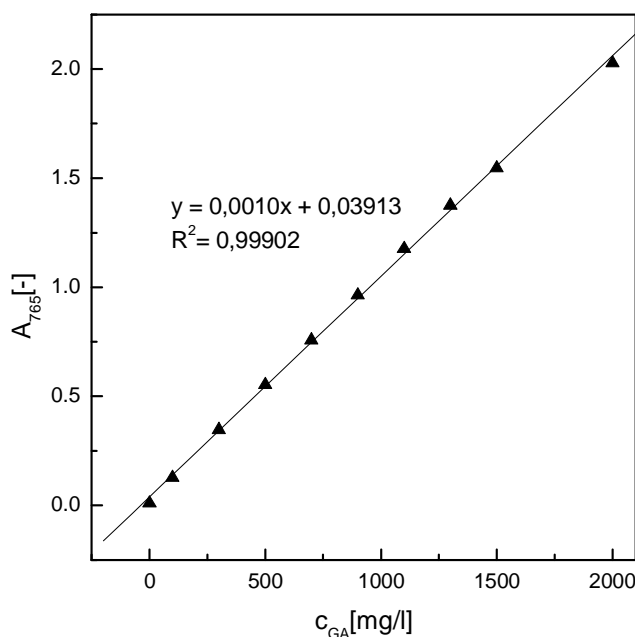
Veškeré výsledky byly zpracovány pomocí softwaru OriginPro v.7.0 (MicroCalc, USA) a jsou vyjádřeny ve tvaru průměr \pm směrodatná odchylka, každý vzorek byl proměřen dvakrát ($n = 2$).

Pro zjištění rozdílů mezi vzorky byla použita parametrická jednofaktorová analýza rozptylu metoda ANOVA s využitím Tukeyho HSD-testu. Vzhledem k velkému souboru dat byly výsledky zpracovány také metodami vícerozměrné statistiky, metodou hlavních komponent, faktorovou analýzou s rotací Varimax. Diskriminační analýza dat podle zvolených kritérií byla realizována pomocí kanonické diskriminační analýzy a metodou k-tého nejbližšího souseda s využitím statistického softwaru Unistat, v. 6.0 (Unistat, Velká Británie). Veškeré statistické testování bylo provedeno na hladině statistické významnosti $\alpha = 0,05$.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Stanovení celkových polyfenolů (TPC)

Celkový obsah polyfenolických látek v příslušných extraktech (50% ethanol, destilovaná voda, DMSO) odrůd *Aronia melanocarpa* a *Amelanchier alnifolia* rok sběru 2012 a 2013 byl stanoven modifikovanou metodou podle Chaovanalikita a Wrolstada [142]. Výsledné hodnoty TPC byly vyjádřeny jako GAE [g/kg] pomocí kalibrační křivky sestavené ze standardů kyseliny gallové. Naměřená kalibrační křivka je znázorněna na Obr. 23.



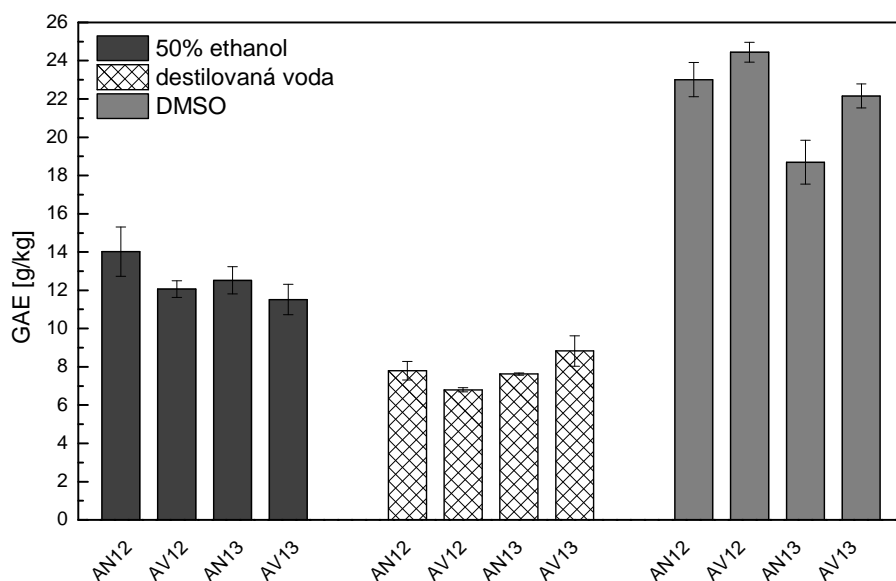
Obr. 23: Kalibrační křivka standardních roztoků kyseliny gallové – závislost absorpance při 765 nm na koncentraci

5.1.1 Vliv extrakčních podmínek na obsah polyfenolů v odrůdách aronie

Z výsledků, které jsou shrnuty na *Obr. 24*, je patrné, že vzorky aronie jsou bohatým zdrojem polyfenolických látek. Z dostupných publikací vyplývá, že celkový obsah polyfenolů se u aronie pohybuje v rozmezí 6,9–42,1 g/kg [12–14]. Průměrné obsahy TPC v analyzovaných vzorcích se pohybovaly v 50% ethanolu v rozmezí 11,5–14,0 g/kg, v destilované vodě 7,6–8,8 g/kg a v DMSO 18,7–24,4 g/kg, což je v dobrém souladu s výsledky uvedenými ve zmíněných publikacích.

Z *Obr. 24* jasně vyplývá, že obsah celkových polyfenolů je výrazně ovlivňován volbou extrakčního činidla. Koncentrace TPC se snižuje ve směru DMSO > 50% ethanol > destilovaná voda. Hodnoty celkových polyfenolů u extraktů v DMSO jsou přibližně 2krát vyšší oproti ethanolovým resp. vodným extraktům. Co se týče porovnání obsahu TPC vodných a ethanolových extraktů aronie, z *Obr. 24* je patrné, že ve vodném prostředí byly zjištěny přibližně o 40 % nižší koncentrace polyfenolických látek než v případě extraktů ethanolových. Ignat a kol. [80] potvrzují, že destilovaná voda je méně vhodným rozpouštědlem pro extrakci těchto látek, naopak vhodnějšími rozpouštědly jsou okyselené vodné roztoky methanolu nebo ethanolu.

Pozorované rozdíly v obsahu TPC souvisí především s charakterem jednotlivých rozpouštědel. DMSO (tabelovaná hodnota relativní permitivity $\epsilon_{DMSO} = 46$) je polárním aprotickým rozpouštědlem, které je schopné extrahovat jak polární tak i nepolární látky, kdežto destilovaná voda ($\epsilon_{H_2O} = 78,3$) a ethanol ($\epsilon_{ETOH} = 24,3$) jsou rozpouštědla polární protická, která rozpouští hlavně polární látky [88, 147, 148]. Vzhledem ke specifickému charakteru DMSO byly extrahovány i nepolární složky, v důsledku čehož byly zaznamenány vyšší koncentrace polyfenolických látek v tomto extrakčním činidle. Na základě výsledků měření lze tedy konstatovat, že DMSO se jeví jako nejvhodnější činidlo pro extrakci těchto látek.



Obr. 24: Celkový obsah polyfenolických látek v ethanolových, vodných a DMSO extraktech aronie stanovený proti standardu kyseliny gallové (GAE, g/kg). Označení vzorků je uvedeno v Tab. 9.

Z údajů prezentovaných na Obr. 24 také vyplývá, že obsah TPC v příslušných extraktech se mění v závislosti na roku produkce nebo vybrané odrůdě. I když je z výsledků patrné, že v ethanolových extraktech u odrůd aronie sklizených v roce 2012 byly zjištěny mírně vyšší hodnoty TPC, zatímco ve vodných extraktech byly stanoveny vyšší koncentrace polyfenolických látek v odrůdách sklizených v roce 2013, tyto rozdíly mezi jednotlivými roky produkce lze na základě analýzy ANOVA označit ze statisticky nevýznamné ($P_{\text{EtOH}} = 0,2530$, $P_{\text{H}_2\text{O}} = 0,1298$).

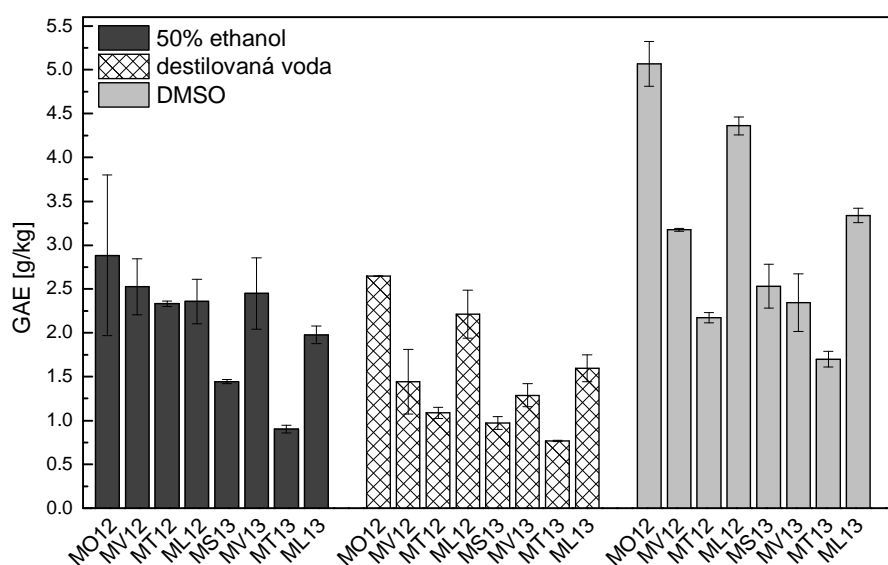
Zatímco u ethanolových a vodných extraktů nejsou zřejmé výrazné rozdíly mezi jednotlivými odrůdami aronie a roky produkce, v případě extraktů připravených do DMSO je zřejmá značná variabilita hodnot TPC, jak mezi odrůdami, tak i mezi jednotlivými roky produkce. Obecně, odrůda Viking byla charakterizována vyššími koncentracemi polyfenolických látek než odrůda Nero, avšak tento rozdíl lze na základě statistické analýzy považovat za nevýznamný. Vezmou-li se však v úvahu jednotlivé roky produkce, bez ohledu na odrůdu tento rozdíl, kdy odrůdy Nero i Viking sklizené v roce 2012 byly charakteristické vyšším obsahem polyfenolických látek než odrůdy z roku 2013, lze označit jako statisticky významný ($P = 0,0316$).

Uvedené rozdíly je možné dát do přímé souvislosti zejména s klimatickými vlivy. Počasí a doba sběru mohou ovlivňovat obsah polyfenolických látek. Z dostupných meteorologických dat z Mendelovy univerzity v Brně vyplývá, že v roce 2013 byly naměřeny vyšší teploty a vyšší množství srážek než v roce 2012. Teplota značně ovlivňuje hlavně obsah flavonoidů a anthokyanů, které jsou citlivé na vyšší teploty. Obsah polyfenolů tedy závisí hlavně na klimatických podmínkách, analyzovaném kultivaru, době sběru, ale i na způsobu skladování, což potvrzují ve své práci i Jakobek a kol. [12].

5.1.2 Vliv extrakčních podmínek na obsah polyfenolů v odrůdách muchovníku

Plody muchovníku lze také považovat za bohatý zdroj polyfenolických látek, avšak oproti plodům aronie jejich koncentrace je podstatně nižší, což je podmíněno odlišnou druhovou a odrůdovou skladbou polyfenolických látek vyplývající z odrůdových rozdílů jednotlivých druhů ovoce a proto jsme se dále tímto aspektem nezabývali.

Průměrné hodnoty TPC extraktů muchovníků jsou zobrazeny na *Obr. 25*. U ethanolových extraktů se stanovené hodnoty koncentrace PC pohybovaly v rozmezí 0,9–2,9 g/kg, u vodných extraktů 0,8–2,7 g/kg a u DMSO extraktů 1,7–5,1 g/kg. Stanovené koncentrace odpovídají údajům v dostupných publikacích, kde se rámcově uvádí TPC v intervalu 0,5–3,8 g/kg u methanolových extraktů muchovníku [64, 67]. U DMSO extraktů odrůd Ostravský 2012 a Lamarckii Balerina 2012, byly stanoveny vyšší hodnoty TPC, než je uvedeno v literatuře, což je možné dát do souvislosti s vlivem rozpouštědla na průběh extrakce a kvalitu extraktů.



Obr. 25: Celkový obsah polyfenolických látek v ethanolových, vodných a DMSO extraktech muchovníku stanovený oproti standardu kyseliny gallové (GAE, g/kg). Označení vzorků je uvedeno v Tab. 9.

Z *Obr. 25* je zřejmé, že celkový obsah polyfenolů, je obdobně jako u extraktů aronie, výrazně ovlivněn volbou extrakčního činidla. Hodnoty celkových polyfenolů u extraktů v DMSO jsou přibližně o 50 % vyšší oproti ethanolovým i vodným extraktům, což odpovídá výsledkům stanovení TPC v extraktech aronie. DMSO poskytuje nejvyšší koncentrace polyfenolických látek obdobně jako u extraktů aronie, a proto se považuje za nejvhodnější činidlo pro extrakci polyfenolů. Porovnáme-li hodnoty TPC ethanolových a vodných extraktů, z výsledků vyplývá, že tato dvě rozpouštědla jsou v některých případech (MO12, ML12, MT13), z hlediska efektivity extrakce polyfenolických látek z muchovníku, porovnatelné při zohlednění chyby měření.

Z prezentovaných údajů jsou patrné také rozdíly ve skladbě polyfenolů mezi jednotlivými odrůdami muchovníků. Ve všech vybraných extrakčních činidlech byly stanoveny nejvyšší obsahy polyfenolických látek u odrůdy Ostravský 2012 ($GAE_{EtOH} = 2,9$ g/kg; $GAE_{H_2O} = 2,7$ g/kg; $GAE_{DMSO} = 5,1$ g/kg) a nejnižší u odrůdy Thiessen 2013 ($GAE_{EtOH} = 0,9$ g/kg; $GAE_{H_2O} = 0,8$ g/kg; $GAE_{DMSO} = 1,7$ g/kg).

Co se týče porovnání rozdílů mezi odrůdami sklizenými v roce 2012 a 2013, z výsledků jasně vyplývá, že vyšší koncentrace polyfenolů byly zjištěny u odrůd z roku 2012 v porovnání s rokem 2013, přičemž tyto rozdíly lze považovat za statisticky významné ($P_{EtOH} = 0,0092$; $P_{H_2O} = 0,0223$; $P_{DMSO} = 0,0236$). Trend vyšších hodnot TPC u odrůd z roku 2012 je nejvíce patrný u párových odrůd Thiessen a Lamarckii Balerina, bez ohledu na typ rozpouštědla. Tyto rozdíly mezi jednotlivými roky produkce mohou opět souviset s odlišnými klimatickými podmínkami diskutovanými výše.

5.2 Stanovení celkových anthokyanů v odrůdách aronie a muchovníků

Celkový obsah anthokyanů ve vybraných odrůdách aronie a muchovníků byl stanoven pH diferentní metodou podle Guisti a Wrolstada [143]. Obsah celkových anthokyanů byl zjištěn přepočtem na standard kyanidin-3-glukosid, který je nejčastěji používaným standardem při stanovení celkových anthokyanů [13, 71, 86].

5.2.1 Vliv extrakčních podmínek na obsah anthokyanů u odrůd aronie

Průměrné hodnoty TPC a TAC v extraktech jednotlivých odrůd aronie jsou shrnuty v *Tabulce 11*. Z výsledků stanovení vyplývá, že koncentrace celkových anthokyanů v plodech aronie je několikanásobně nižší než celková koncentrace polyfenolických látek, což je dáno skutečností, že polyfenolické látky jsou souhrnem velkého množství sloučenin jako prokyanidiny, anthokyanany, fenolické kyseliny, lignany a další flavonoidy [28]. Anthokyanany jsou jednou z frakcí polyfenolů, proto jejich koncentrace je podstatně nižší než koncentrace celkových polyfenolů.

Tabulka 11: Naměřené hodnoty TPC a TAC všech vybraných extraktů aronie

ID aronie	GAE _{50% ethanol} [g/kg]	GAE _{voda} [g/kg]	GAE _{DMSO} [g/kg]
AN12	14,0 ± 1,3	7,8 ± 0,5	23,0 ± 0,9
AV12	12,1 ± 0,4	6,8 ± 0,1	24,4 ± 0,5
AN13	12,5 ± 0,7	7,6 ± 0,1	18,7 ± 1,1
AV13	11,5 ± 0,8	8,8 ± 0,8	22,2 ± 0,6
ID aronie	TAC _{50% ethanol} [g/kg]	TAC _{voda} [g/kg]	TAC _{DMSO} [g/kg]
AN12	2,9 ± 0,0	1,7 ± 0,1	3,8 ± 0,0
AV12	4,3 ± 0,1	1,9 ± 0,0	6,5 ± 0,0
AN13	4,5 ± 0,0	2,2 ± 0,1	4,3 ± 0,1
AV13	4,0 ± 0,0	2,3 ± 0,1	6,1 ± 0,0

Z *Tabulky 11* dále vyplývá, že u většiny vyšlechtěných odrůd aronie se zjištěný obsah celkových anthokyanů pohybuje v rozmezí publikovaných hodnot, 3,6–8,0 g/kg [5, 12, 13] s výjimkou vodných extraktů všech odrůd a ethanolového extraktu odrůdy Nero 2012. Zjištěný nižší obsah TAC u vodných extraktů je dán především charakterem rozpouštědla, které má nižší schopnost vyextrahovat anthokyanany [80]. V případě ethanolového extraktu odrůdy Nero 2012, nižší obsah anthokyanů může souviset s odlišnými vegetačními podmínkami, způsobem manipulace s ovocem, případně může být ovlivněn i kvalitou půdy.

Z prezentovaných údajů je zřejmé, že koncentrace celkových anthokyanů je závislá na použitém extrakčním činidlu. Schopnost extrakce anthokyanů stoupá v pořadí destilovaná voda < 50% ethanol < DMSO. Z výsledků měření jsou patrné i určité odrůdové rozdíly, kdy u ethanolových extraktů byl stanoven nejvyšší obsah celkových anthokyanů u odrůdy Nero

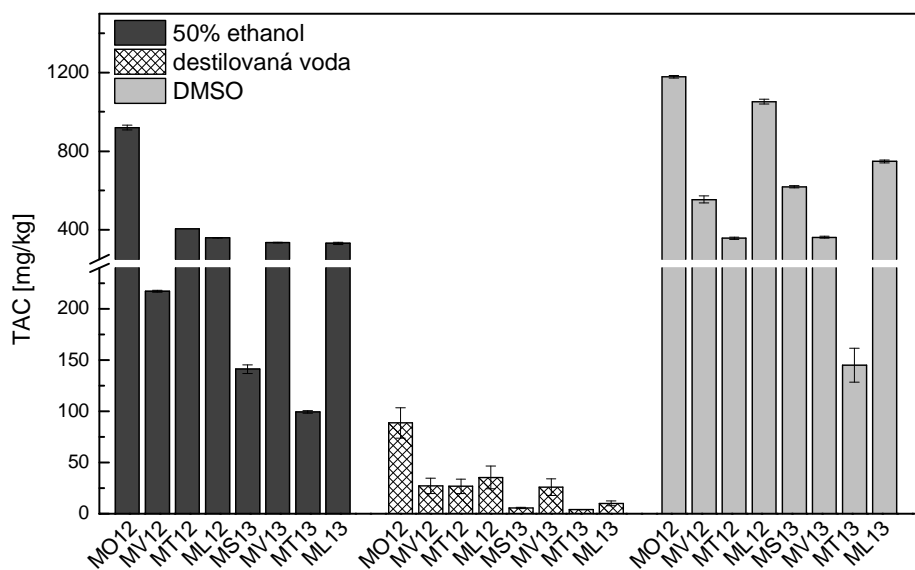
2013, u vodných extraktů naopak u odrůdy Viking 2013 a u DMSO extraktů u odrůdy Viking 2012, zatímco nejnižší obsah anthokyanů byl ve všech rozpouštědlech stanoven u odrůdy Nero 2012. Avšak z hlediska komparace odrůdy Nero a Viking, bez ohledu na rok produkce, vyplývá, že odrůda Viking byla charakterizována vyššími hodnotami TAC než odrůda Nero. Z údajů uvedených v *Tabulce 11* jsou zřejmé také určité odlišnosti obsahu anthokyanů v rámci jednotlivých roků produkce. Z výsledků statistické analýzy vyplývá, že pro odrůdy sklizené v roce 2013 byly typické vyšší hodnoty TAC než u odrůd roku 2012, avšak tyto rozdíly lze považovat za statisticky nevýznamné, s výjimkou vodných extraktů ($P_{H_2O}=0,0017$).

Anthokyaniny jsou velmi nestabilní sloučeniny, které podléhají degradaci účinkem zvýšené teploty, osvětlení, změnou pH a přítomností kyslíku [91]. Jejich obsah může být značně ovlivněn těmito faktory, takže i vegetační podmínky, lokalita a množství denního světla může mít vliv na obsah těchto sloučenin v plodech.

5.2.2 Vliv extrakčních podmínek na obsah anthokyanů u odrůd muchovníku

Výsledky měření (*Obr. 26*) potvrzují, že muchovník je také dobrým zdrojem anthokyanových barviv, avšak v porovnání s aronií je obsah těchto látek podstatně nižší. Obvykle se obsah anthokyanů v muchovníku pohybuje v rozmezí 251–1 790 mg/kg [64, 71]. Experimentálně byl zjištěn obsah celkových anthokyanů v ethanolových extraktech 99,3–920,4 mg/kg, ve vodných extraktech 4,2–88,7 mg/kg a DMSO extraktech 362,2–1 178,5 mg/kg. Z těchto údajů je zřejmé, že ve většině případů námi stanovené hodnoty TAC jsou ve velmi dobré shodě s údaji publikovanými v dostupné literatuře s výjimkou vodných a ethanolových extraktů odrůd Tišnovský velkoplodý 2012, Tišnovský školský 2013 a Thiessen 2013. Stejně jako v případě stanovení TPC, nižší koncentrace TAC v uvedených vzorcích může souviset jak s charakterem rozpouštědla, tak i lokalitou růstu, klimatickými podmínkami i samotnou manipulací s plody. Stejně jako u extraktů aronie, tak i v tomto případě se ukázalo, že DMSO je nejvhodnějším extrakčním činidlem pro extrakci anthokyanů, zatímco destilovaná voda nejhorším. Korelace s fyzikálně-chemickými vlastnostmi rozpouštědla, zejména relativní permitivitou diskutovanou výše, je zjevná.

Podle očekávání, ve všech rozpouštědlech byly nejvyšší koncentrace anthokyanů stanoveny u odrůdy Ostravský 2012, naopak nejnižší u odrůdy Thiessen 2013, což souhlasí s výsledky stanovení celkových polyfenolů. Výsledky stanovení anthokyanů naznačují sezonní vlivy - bez ohledu na odrůdy, rok 2012 byl charakteristický vyšším obsahem celkových anthokyanů v porovnání s rokem 2013, v případě ethanolových a vodných extraktů lze tyto rozdíly označit za statisticky významné ($P_{EtOH} = 0,0378$, $P_{H_2O} = 0,0080$).



Obr. 26: Celkový obsah anthokyanů v ethanolových, vodných a DMSO extraktech muchovníku přepočtený na standard kyanidin-3-glukosid (TAC, mg/kg). Označení vzorků je uvedeno v Tab. 9.

5.3 Stanovení barevných charakteristik v plodech aronie a muchovníků

Barevné souřadnice L^* , a^* , b^* , chromaticita a úhel barevného odstínu jednotlivých extraktů aronie a muchovníků byly stanovené z naměřených spekter za podmínek 10° pozorovatel a standardního zdroje osvětlení Illuminat D65.

5.3.1 Vliv extrakčních podmínek na barevné charakteristiky aronie

Naměřené barevné charakteristiky extraktů aronie v jednotlivých rozpouštědlech jsou uvedeny v *Tabulce 12*. Výsledky měření ukazují stejný trend jako v případě stanovení celkových polyfenolů a anthokyanů. I barevné charakteristiky jsou značně ovlivněny výběrem extrakčního činidla, kdy každé rozpouštědlo poskytuje odlišné hodnoty barevných parametrů. U všech extraktů aronie se složka světlosti L^* blíží k hodnotě 100, což značí, že všechny extrakty jsou čiré, s výrazným světlým tónem. Hodnota světlosti jednotlivých rozpouštědel klesá v pořadí DMSO > voda > 50% ethanol, přičemž rozdíl hodnot L^* mezi vodou a 50% ethanolem lze považovat za statisticky nevýznamný.

Chromatická složka a^* , která značí zastoupení červené nebo zelené barvy, se ve všech extraktech aronie pohybuje v kladných hodnotách, což ukazuje, že v extraktech je dominantněji zastoupena červená barva, především u ethanolových a vodných extraktů. Červená barva extraktů je způsobena především přítomností anthokyanových barviv. Z tohoto důvodu bychom očekávali vyšší hodnoty parametru a^* u DMSO extraktů, vzhledem k tomu, že DMSO představovalo nejúčinnější extrahovadlo z hlediska extrakce anthokyanů, avšak z údajů uvedených v *Tabulce 12* je zřejmé, že právě v případě těchto extraktů byly stanoveny nejnižší hodnoty a^* .

Naproti tomu, u chromatické složky b^* značící zastoupení žluté nebo modré barvy, byly v DMSO extraktech stanoveny nejvyšší hodnoty. Ethanolové extrakty aronie mají dokonce složku b^* v záporných hodnotách, což znamená, že v extraktech je dominantněji zastoupena modrá barva.

Tabulka 12: Naměřené barevné charakteristiky ethanolových, vodných a DMSO extraktů aronie

ID aronie	L*	a*	b*	chromaticita	úhel bar. odstínu
<i>50% ethanol</i>					
AN12	94,9 ± 0,6	5,5 ± 1,1	-0,4 ± 0,4	5,4 ± 1,1	355,8 ± 2,8
AV12	93,0 ± 0,1	9,7 ± 0,3	-2,3 ± 0,0	9,4 ± 0,4	346,8 ± 0,3
AN13	92,3 ± 0,1	11,1 ± 0,2	-2,7 ± 0,0	11,5 ± 0,4	346,5 ± 0,2
AV13	94,1 ± 0,7	8,4 ± 0,9	-1,9 ± 0,3	8,1 ± 1,1	347,3 ± 0,4
<i>destilovaná voda</i>					
AN12	96,8 ± 0,2	4,5 ± 0,3	0,2 ± 0,0	4,6 ± 0,3	2,8 ± 0,7
AV12	94,9 ± 0,0	9,6 ± 0,2	0,3 ± 0,0	9,2 ± 0,2	1,7 ± 0,5
AN13	94,3 ± 0,1	10,5 ± 0,2	0,1 ± 0,0	10,7 ± 0,2	1,0 ± 0,4
AV13	93,9 ± 0,7	10,8 ± 1,5	0,24 ± 0,0	10,7 ± 1,6	1,3 ± 0,5
<i>DMSO</i>					
AN12	96,5 ± 0,2	1,9 ± 0,1	1,8 ± 0,1	2,4 ± 0,4	47,5 ± 2,6
AV12	98,8 ± 0,0	0,2 ± 0,0	1,7 ± 0,1	1,8 ± 0,1	83,4 ± 0,8
AN13	99,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0	2,2 ± 0,2	2,2 ± 0,2	93,5 ± 0,2
AV13	98,6 ± 0,1	0,4 ± 0,0	1,6 ± 0,1	1,6 ± 0,1	76,3 ± 1,2

Hodnoty chromaticity, která charakterizuje sytost a dominantní délku barvy, kolísají v 50% ethanolu v rozmezí 5,4–11,5 %, u destilované vody 4,6–10,7 % a DMSO 1,8–2,4 %. Všechny extrakty mají méně sytý odstín, vzhledem k tomu, že se hodnoty chromaticity více blíží k šedému bodu, který odpovídá hodnotě chromaticity 0 %. Také v úhlu barevného odstínu (*Tabulka 12*) jsou mezi jednotlivými extrakčními činidly značné rozdíly. Ethanolové extrakty aronie mají hodnoty barevného odstínu v rozmezí 347,3–355,8, což odpovídá tmavě červenému zbarvení, vodné extrakty v rozmezí 0,9–2,8, což odpovídá světle červené barvě a DMSO extrakty v rozmezí 47,5–93,5, což odpovídá přechodu mezi žlutou až zelenou barvou. *Obr. 27* ukazuje, jaké hodnoty barevného odstínu přísluší dané barvě.



Obr. 27: Hodnoty barevného odstínu [106]

5.3.2 Vliv extrakčních podmínek na barevné charakteristiky muchovníku

Naměřené barevné charakteristiky extraktů muchovníků v jednotlivých rozpouštědlech jsou uvedeny v *Tabulce 13*. Složka světlosti L*, se stejně jako u extraktů aronie blíží hodnotě 100, avšak v tomto případě jsou tyto hodnoty vyšší, což značí, že extrakty muchovníků jsou světlejší. Hodnoty L* extraktů muchovníků klesají v pořadí DMSO > voda > 50% ethanol.

Tabulka 13: Naměřené barevné charakteristiky ethanolových, vodných a DMSO extraktů muchovníku

ID aronie	L*	a*	b*	chromaticita	úhel bar. odstínu
<i>50% ethanol</i>					
MO12	97,8 ± 0,3	2,1 ± 0,7	0,7 ± 0,1	2,1 ± 0,6	24,2 ± 7,7
MV12	98,8 ± 0,1	0,7 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,7 ± 0,2	58,9 ± 0,7
MT12	98,5 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,5 ± 0,2	51,8 ± 0,9
ML12	98,5 ± 0,1	0,9 ± 0,0	1,4 ± 0,2	1,5 ± 0,2	55,5 ± 2,4
MS13	99,2 ± 0,2	0,5 ± 0,0	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,1	64,7 ± 1,5
MV13	99,2 ± 0,2	0,8 ± 0,2	0,2 ± 0,0	0,8 ± 0,2	12,6 ± 5,7
MT13	99,1 ± 0,0	0,3 ± 0,0	1,5 ± 0,2	1,7 ± 0,3	76,3 ± 0,8
ML13	99,1 ± 0,1	0,8 ± 0,0	0,7 ± 0,0	1,0 ± 0,1	39,6 ± 1,0
<i>destilovaná voda</i>					
MO12	98,3 ± 0,0	0,8 ± 0,1	2,9 ± 0,3	3,3 ± 0,4	74,7 ± 1,6
MV12	98,8 ± 0,1	0,3 ± 0,1	2,9 ± 0,3	2,9 ± 0,3	84,8 ± 0,5
MT12	98,9 ± 0,0	0,3 ± 0,0	2,4 ± 0,2	2,6 ± 0,2	84,3 ± 0,1
ML12	98,7 ± 0,1	0,4 ± 0,1	2,5 ± 0,3	2,5 ± 0,4	81,7 ± 1,0
MS13	99,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	2,4 ± 0,1	2,4 ± 0,1	85,6 ± 0,7
MV13	99,5 ± 0,1	0,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1	80,4 ± 3,5
MT13	99,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	2,5 ± 0,1	2,5 ± 0,1	86,2 ± 0,3
ML13	99,0 ± 0,1	0,3 ± 0,0	2,4 ± 0,1	2,4 ± 0,1	83,5 ± 0,6
<i>DMSO</i>					
MO12	99,0 ± 0,1	0,2 ± 0,0	1,7 ± 0,1	1,7 ± 0,1	84,8 ± 0,4
MV12	99,2 ± 0,1	0,3 ± 0,0	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	71,2 ± 1,5
MT12	99,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,8 ± 0,0	0,8 ± 0,1	69,4 ± 4,3
ML12	98,9 ± 0,1	0,3 ± 0,1	1,4 ± 0,0	1,4 ± 0,0	76,0 ± 2,9
MS13	99,4 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0	89,8 ± 1,3
MV13	99,4 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	89,7 ± 3,2
MT13	99,6 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0	87,1 ± 0,7
ML13	99,6 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1	87,8 ± 0,6

Chromatická složka a* se u extraktů muchovníku pohybuje v kladných hodnotách, což signalizuje dominantnější zastoupení červené barvy, avšak oproti extraktům aronie jsou tyto hodnoty nižší. V DMSO extraktech byly opět stanoveny nejnižší hodnoty chromatické složky a*, nejvyšší pak v ethanolových extraktech.

Hodnoty chromatické složky b* pohybující se v kladných hodnotách odráží výraznější zastoupení žluté barvy, což může souviset s obsahem anthokyanů, ale i karotenoidů. Hodnoty b* klesají v pořadí voda > 50% ethanol > DMSO.

Hodnoty chromaticity extraktů muchovníku v 50% ethanolu se pohybují v rozmezí 0,8–2,1 % v destilované vodě 1,2–3,3 % a v DMSO 0,7–1,7 %. Rozdíly v hodnotách chromaticity mezi jednotlivými rozpouštědly lze považovat za statisticky významné.

Také v úhlu barevného odstínu jsou mezi jednotlivými extrakčními činidly rozdíly. Hodnoty barevného odstínu ethanolových extraktů se pohybovaly v rozmezí 12,6–76,3, což

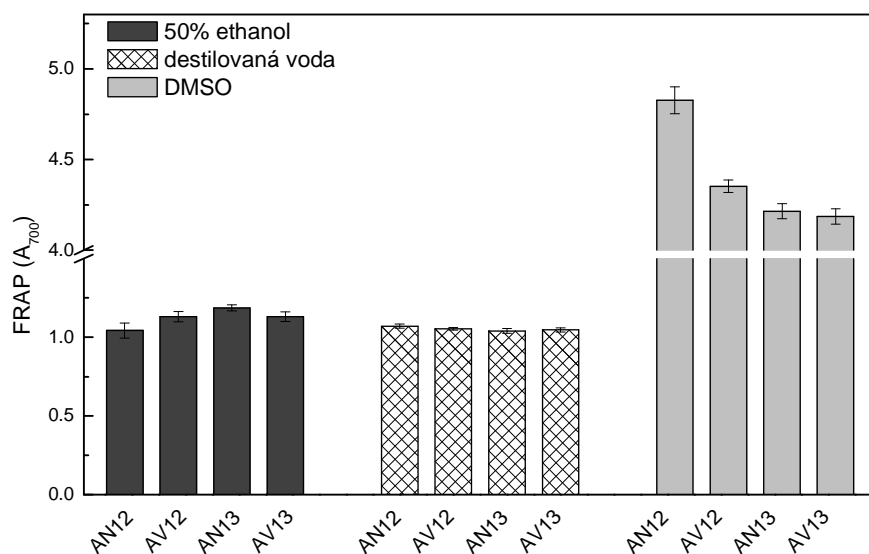
odpovídá oranžovo hnědé barvě, vodných extraktů v rozmezí 74,7–86,2 a u DMSO extraktů v rozmezí 69,4–89,8, což odpovídá přechodu mezi žlutou až zelenou barvou.

5.4 Stanovení schopnosti aronie a muchovníku redukovat železitě ionty

Schopnost extraktů aronie nebo muchovníků redukovat Fe^{3+} na Fe^{2+} byla testována metodou podle Chyau a kol. [144].

5.4.1 Vliv extrakčních podmínek na redukční schopnost extraktů aronie

Na *Obr. 28* jsou prezentovány průměrné hodnoty FRAP, jako míry schopnosti extraktů aronie redukovat železitě ionty na ionty železnaté. Z prezentovaných výsledků je patrné, že schopnost extraktů redukovat Fe^{3+} je rovněž ovlivněna volbou extrakčního činidla. Hodnoty FRAP ethanolových a vodných extraktů jsou porovnatelné, přičemž v tomto případě nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly hodnot FRAP v rámci jednotlivých odrůd nebo produkčních roků. Naproti tomu, u DMSO extraktů je zřejmá větší variabilita jak mezi odrůdami, tak i roky produkce. Nejvyšší schopnost redukovat železitě ionty v DMSO vykazovala odrůda Nero 2012 (4,8), nejnižší pak odrůda Viking 2013 (4,2). Obecně, u DMSO extraktů u odrůd sklizených v roce 2012 byly stanoveny vyšší hodnoty FRAP než v roce 2013, přičemž odrůda Nero, bez ohledu na rok sběru, byla charakteristická vyšší schopností redukovat železitě ionty. Z výsledků je zřejmé, že vzorky aronie mají schopnost redukce železitých iontů na ionty železnaté, což potvrzují i Kulling a Rawell [5].



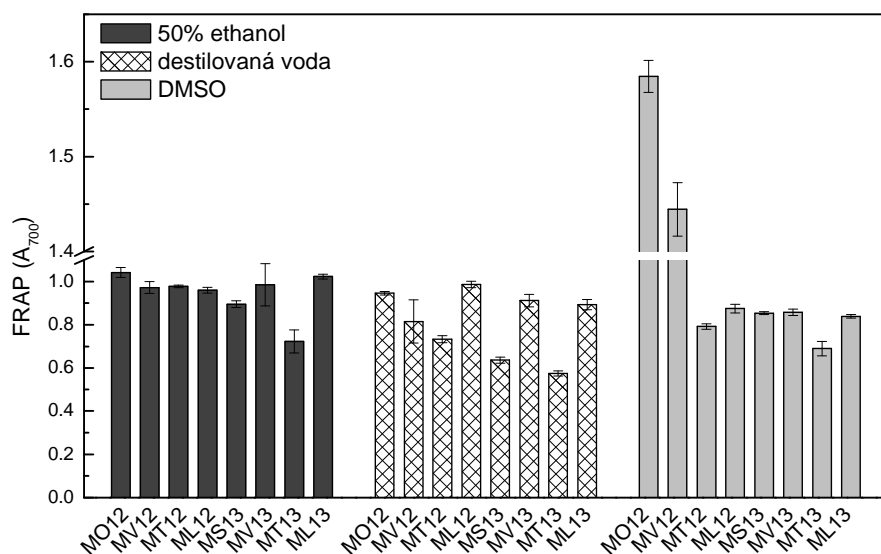
Obr. 28: Průměrné hodnoty FRAP ethanolových, vodných a DMSO extraktů aronie. Označení vzorků je uvedeno v Tab. 9.

5.4.2 Vliv extrakčních podmínek na redukční schopnost extraktů muchovníku

Průměrné hodnoty FRAP extraktů muchovníků v jednotlivých rozpouštědlech jsou zobrazeny na *Obr. 29*. Na první pohled se tyto hodnoty výrazně nemění v závislosti na použitém extrakčním činidlu, výjimkou jsou DMSO extrakty odrůd Ostravský 2012 a Tišnovský velkoplodý 2012.

Z prezentovaných údajů je rovněž zřejmé, že ve většině případů jsou u ethanolových a DMSO extraktů statisticky nevýznamné rozdíly hodnot FRAP mezi jednotlivými odrůdami, zatímco u vodných extraktů je patrná větší variabilita dat.

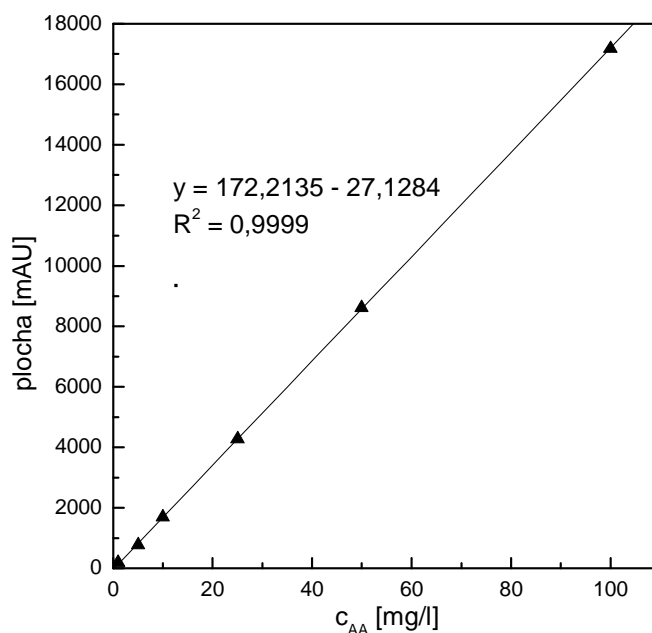
Co se týká sezonního vlivu na hodnoty FRAP, z výsledků měření vyplývá, že odrůdy sklizené v roce 2012 byly, bez ohledu na typ rozpouštědla, charakteristické vyššími hodnotami FRAP než odrůdy z roku 2013, avšak pouze u DMSO extraktů je možné tyto rozdíly považovat za statisticky významné ($P = 0,0164$).



Obr. 29: Průměrné hodnoty FRAP ethanolových, vodných a DMSO extraktů mučovníku. Označení vzorků je uvedeno v Tab. 9.

5.5 Stanovení kyseliny askorbové v plodech aronie a mučovníků

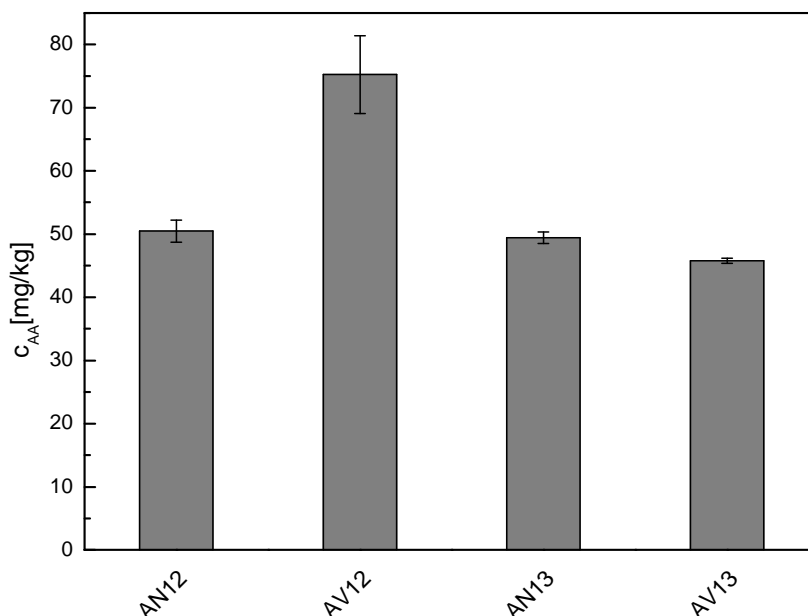
Obsah kyseliny askorbové ve studovaných odrůdách byl stanoven modifikovanou metodou podle Tobolkové a kol. [145] pomocí HPLC-DAD. Z důvodu stabilizace kyseliny askorbové byly plody aronie a mučovníků extrahovány pouze v 2% kyselině metafosforečné. Koncentrace kyseliny askorbové v mg/l byla zjištěna z kalibrační křivky sestavené ze standardů kyseliny askorbové a poté přepočítána na původní navážku a vyjádřena v [mg/kg]. Naměřená kalibrační křivka je znázorněna na Obr. 30.



Obr. 30: Kalibrační křivka standardních roztoků kyseliny askorbové

5.5.1 Koncentrace kyseliny askorbové v odrůdách aronie

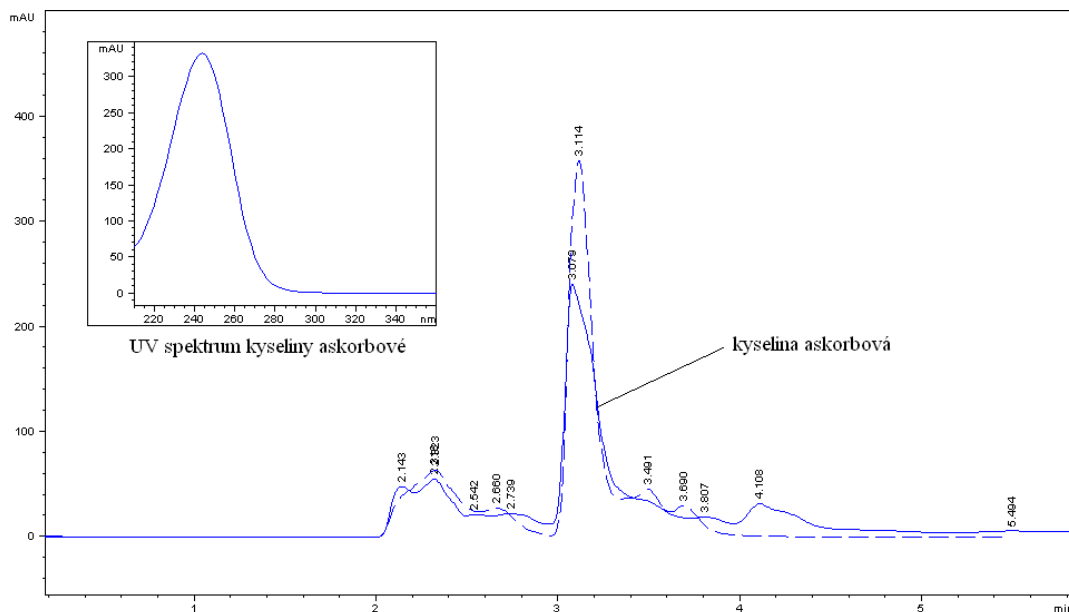
Z výsledků stanovení kyseliny askorbové v plodech aronie zobrazených na *Obr. 31* je patrné, že nejvyšší obsah kyseliny askorbové byl stanoven v odrůdě Viking 2012 (75,2 mg/kg), naopak nejnižší u odrůdy Viking 2013 (45,8 mg/kg).



Obr. 31: Průměrné koncentrace kyseliny askorbové stanovené v odrůdách aronie. Označení vzorků je uvedeno v Tab. 9.

Zatímco je obsah kyseliny askorbové u odrůdy Nero 2012 a 2013 porovnatelný, u odrůdy Viking je její obsah v roce 2012 přibližně o 25 % vyšší než v roce 2013. Průměrný obsah vitamínu C v plodech aronie se pohybuje v rozmezí 50–600 mg/kg [1, 5, 13, 149]. Porovnáme-li výsledky měření s publikovanými daty je zřejmé, že stanovený obsah kyseliny askorbové se pohybuje v rozmezí publikovaných hodnot, avšak je poměrně nízký. Kyselina askorbová je velice nestabilní sloučenina, která se snadno oxiduje v prostředí s vyšším pH, za zvýšené teploty, v přítomnosti atmosférického kyslíku a kovových iontů. Primárním produktem autooxidace je kyselina dehydroaskorbová [28]. Obě tyto kyseliny jsou však složkami vitamínu C, jak je uvedeno v teoretické části práce. V tomto případě byla stanovována pouze kyselina askorbová; aby byla získána celková koncentrace vitamínu C, a tím pádem objektivnější výsledky, bylo by nutné redukovat kyselinu dehydroaskorbovou na askorbovou kyselinu a stanovit je vedle sebe. Toto však nebylo možné z důvodu časového rámce a celkového zaměření práce realizovat.

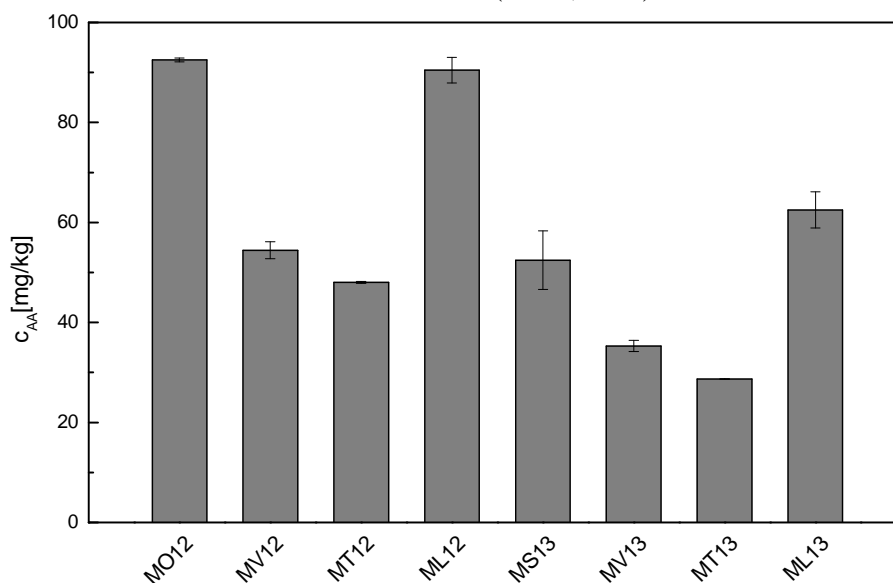
Pro názornost je na *Obr. 32* znázorněn typický chromatogram stanovení kyseliny askorbové odrůdy Viking 2013, který byl překryt příslušným standardem. Kyselina askorbová měla retenční čas kolem 3. minuty a charakteristické UV spektrum při 240 nm.



Obr. 32: Chromatogram kyseliny askorbové odrůdy aronie Viking 2013 (plná čára) překrytý se standardem kyseliny askorbové o koncentraci 10 mg/l (přerušovaná čára)

5.5.2 Koncentrace kyseliny askorbové v odrůdách muchovníku

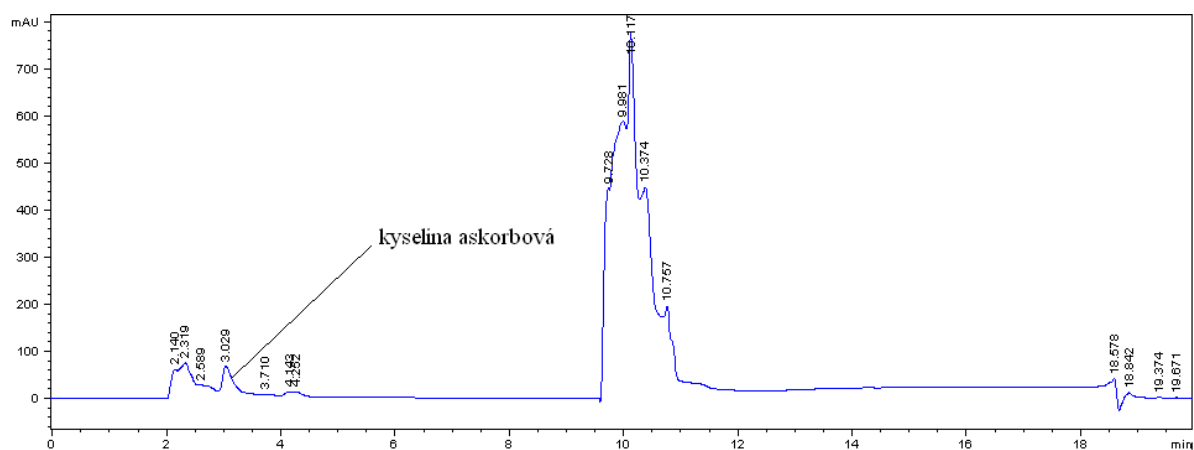
Z výsledků (Obr. 33) je zřejmé, že nejvyšší koncentrace kyseliny askorbové byla zjištěna v odrůdě Ostravský 2012 (92,5 mg/kg) a nejnižší u odrůdy Thiessen 2013 (28,7 mg/kg). Z prezentovaných údajů je patrné, že koncentrace kyseliny askorbové se mění v závislosti na roku produkce. Obecně vyšší koncentrace askorbové kyseliny byly kvantifikovány u odrůd z roku 2012 ($P = 0,0120$), což je zjevné i z porovnání párových vzorků Tišnovský velkoplodý, Thiessen a Lamarckii Balerina. Ze statistického hlediska se nejvýznamnější rozdíly v obsahu kyseliny askorbové, bez ohledu na rok, ukázaly mezi odrůdou Ostravský a odrůdami Tišnovský školský ($P = 0,0420$), Thiessen ($P = 0,0021$) a Tišnovský velkoplodý ($P = 0,0056$), ale i mezi odrůdami Lamarckii Balerina a Thiessen ($P = 0,0221$).



Obr. 33: Průměrné koncentrace kyseliny askorbové stanovené v odrůdách muchovníku. Označení vzorků je uvedeno v Tab. 9.

Koncentrace vitamínu C v muchovníku se pohybuje v rozmezí 35–45 mg/kg [149], ve studii Juříkové a kol. [66] byl dokonce zjištěn obsah vitamínu C ve vyšlechtěných odrůdách muchovníku až 910–1 142 mg/kg. Na základě porovnání výsledků měření s publikovanými daty lze konstatovat, že obsah kyseliny askorbové se v analyzovaných odrůdách muchovníku pohybuje v rozmezí publikovaných hodnot. Výsledky lze považovat za uspokojivé, neboť obsah kyseliny askorbové ve většině odrůd byl vyšší, než jak je uvedeno v databázi USDA [149].

Na Obr. 34 je znázorněn chromatografický záznam analýzy odrůdy Ostravský 2012. Kyselina askorbová se eluovala ve 3. minutě. V retenčním čase 9–12 min docházelo k eluci jednotlivých nepolárních složek, hlavně polyfenolů a anthokyanů, které bylo nutné při každé analýze odstranit z kolony, aby se zabránilo jejímu zanášení.



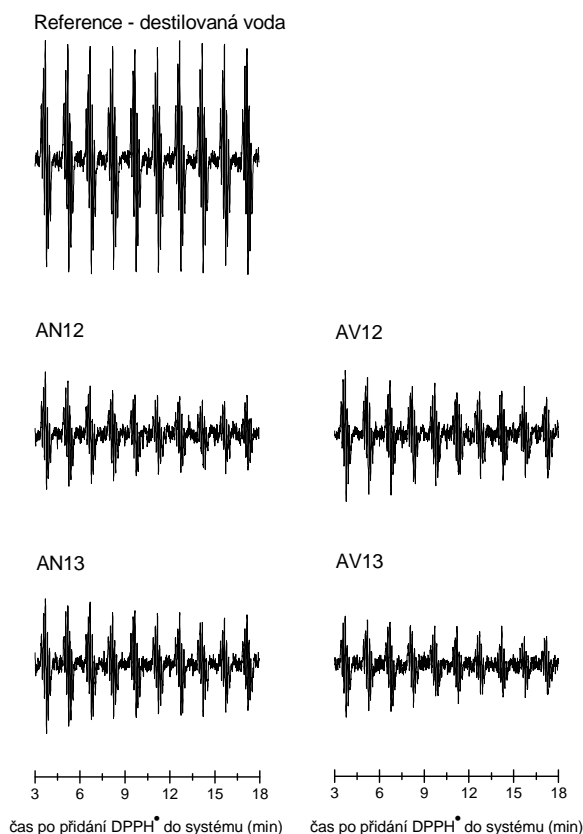
Obr. 34: Chromatogram kyseliny askorbové odrůdy muchovníku Ostravský 2012

5.6 Stanovení \cdot DPPH radikál-zhášecí aktivity plodů aronie a muchovníků

\cdot DPPH radikál-zhášecí aktivita plodů *Aronia melanocarpa* a *Amelanchier alnifolia* byla testována pomocí EPR spektroskopie. Výsledky byly vyjádřeny jako $TEAC_{\cdot$ DPPH}.

5.6.1 Vliv extrakčních podmínek na \cdot DPPH radikál-zhášecí aktivitu aronie

Z Obr. 35 ilustrujícího časový vývoj EPR spekter v systému obsahujícím referenční vzorek (destilovaná voda), resp. vodné extrakty aronie v přítomnosti radikálu \cdot DPPH je zřejmé, že po přidavku radikálu do systému dochází k okamžitému poklesu intenzity EPR spektra, kdežto u referenčního systému EPR spektrum má konstantní průběh v důsledku probíhajících terminačních reakcí mezi \cdot DPPH a složkami extraktu. Jak je uvedeno v teoretické části práce, dochází k terminaci \cdot DPPH na $DPPH_2$ nejběžněji jako elektron-transfer a proton-donorní reakce, ale není vyloučen ani jejich souběžný průběh. Z hlediska kinetiky jsou elektron-transfer reakce rychlejší než proton-transfer [150].

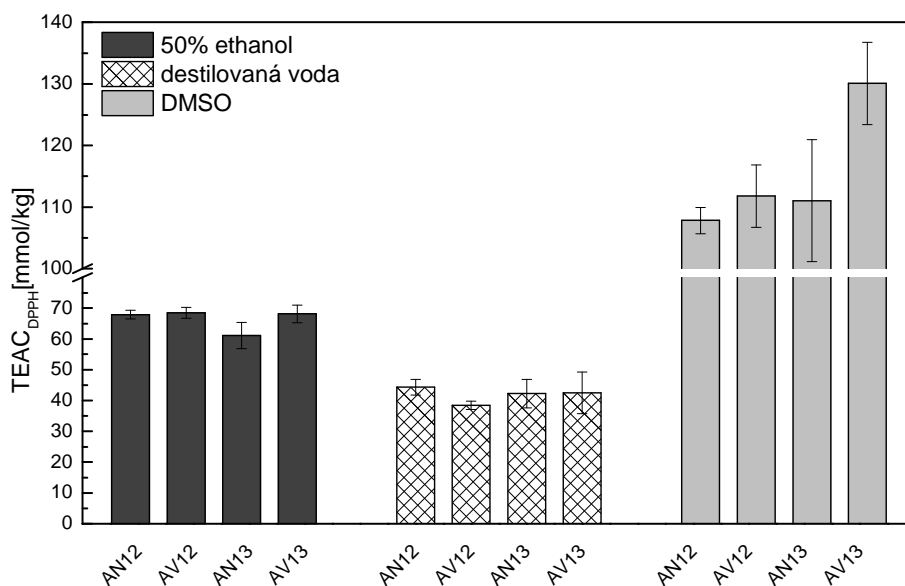


Obr. 35: Časový vývoj EPR spekter (šířka pole, $SW=10$ mT) naměřený v systému obsahujícím destilovanou vodu (reference), resp. příslušné vodné extrakty aronie v přítomnosti radikálu \cdot DPPH ($c_{0(\cdot\text{DPPH})}=1\cdot 10^{-4}$ mol/dm³). Označení vzorků je uvedeno v Tab. 9.

Z Obr. 35 je také patrný zřejmý rozdíl mezi ročníky v rámci jednotlivých odrůd, kdy u odrůdy Nero 2012 byl pozorován vyšší pokles intenzity EPR spektra než u stejné odrůdy v roce 2013, zatímco v případě odrůdy Viking byla situace opačná.

Průměrné hodnoty $\text{TEAC}_{\cdot\text{DPPH}}$ extraktů aronie ve všech rozpouštědlech jsou zobrazeny na Obr. 36. Z výsledků měření je zřejmé, že antioxidační a radikál-zhášející vlastnosti aronie jsou výrazně ovlivňovány volbou rozpouštědla. Hodnoty $\text{TEAC}_{\cdot\text{DPPH}}$ klesají v pořadí DMSO > 50% ethanol > voda. \cdot DPPH radikál-zhášející aktivita DMSO extraktů je přibližně o 40 % vyšší v porovnání s ethanolovými extrakty, porovná-li se pak s vodnými extrakty, tento rozdíl činí téměř 65 %, což velice dobře kopíruje trendy popsané u stanovení celkových polyfenolů a anthokyanů. Tento výsledek je mimo jiné i v dobrém souladu s publikovanými vlivy rozpouštědel na extrakci látek z biologických materiálů a reaktivitu \cdot DPPH [151]. Oba tyto faktory je potřeba vzít v úvahu při komplexním hodnocení výsledků.

Co se týká komparace jednotlivých odrůd, resp. roků produkce, z prezentovaných údajů je zřejmé, že hodnoty $\text{TEAC}_{\cdot\text{DPPH}}$ jak ethanolových, tak i vodných extraktů odrůd Nero a Viking jsou vzájemně porovnatelné, což potvrzují i výsledky statistické analýzy ANOVA ($P_{\text{EtOH}}=0,1354$, $P_{\text{H}_2\text{O}}=0,4160$). Stejný trend byl pozorován i v případě porovnání roků 2012 a 2013, bez ohledu na to, zda se jedná o odrůdu Nero nebo Viking ($P_{\text{EtOH}}=0,1643$, $P_{\text{H}_2\text{O}}=0,7822$).



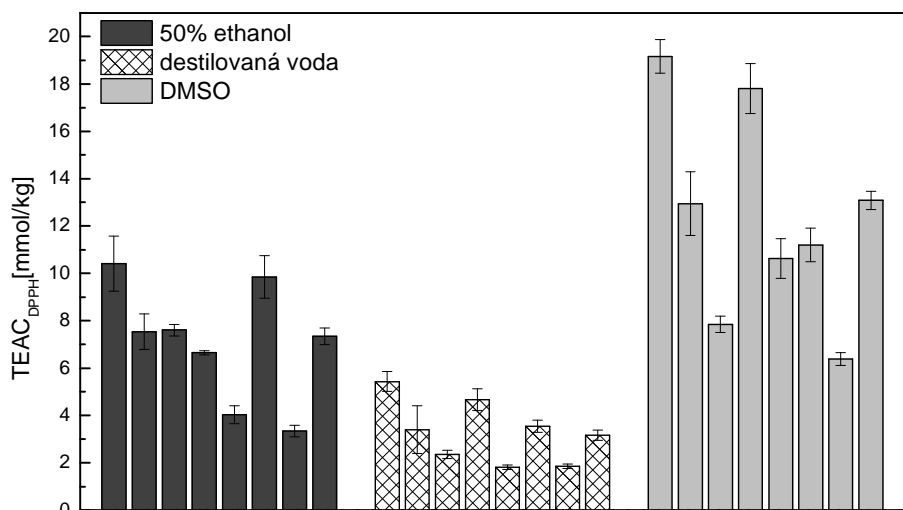
Obr. 36: Průměrné hodnoty $TEAC_{DPPH}$ (mmol/kg) stanovené v ethanolových, vodných a DMSO extraktech aronie. Označení vzorků je uvedeno v Tab. 9.

Z Obr. 36 také vyplývá, že u DMSO extraktů byla odrůda Viking 2013 charakterizována nejvyšší DPPH radikál-zhášející aktivitou v porovnání se zbývajícími vzorky, která přispěla k tomu, že průměrné hodnoty $TEAC_{DPPH}$ stanovené v odrůdách sklizených v roce 2013 byly nepatrně vyšší než u odrůd z roku 2012, avšak ze statistického hlediska lze tento rozdíl označit za nevýznamný. Stejný trend byl pozorován při komparaci DMSO extraktů odrůd Nero a Viking, bez ohledu na produkční rok.

5.6.2 Vliv extrakčních podmínek na DPPH radikál-zhášecí aktivitu muchovníku

Průměrné hodnoty $TEAC_{DPPH}$ extraktů muchovníku jsou znázorněny na Obr. 37. V souladu s výsledky stanovení DPPH radikál-zhášející aktivity extraktů aronie, i v tomto případě se potvrdil očekávaný pokles hodnot $TEAC_{DPPH}$ v pořadí DMSO > 50% ethanol > voda, v důsledku snižující se extrakční účinnosti jednotlivých rozpouštědel. Obecně, nejvyšší hodnoty $TEAC_{DPPH}$ byly stanoveny u odrůdy Ostravský 2012, nejnižší pak v ethanolových a DMSO extraktech u odrůdy Thiessen 2013, zatímco u vodných extraktů byly nejnižší hodnoty $TEAC_{DPPH}$ odrůdy Thiessen 2013 porovnatelné s odrůdou Tišnovský školský 2013.

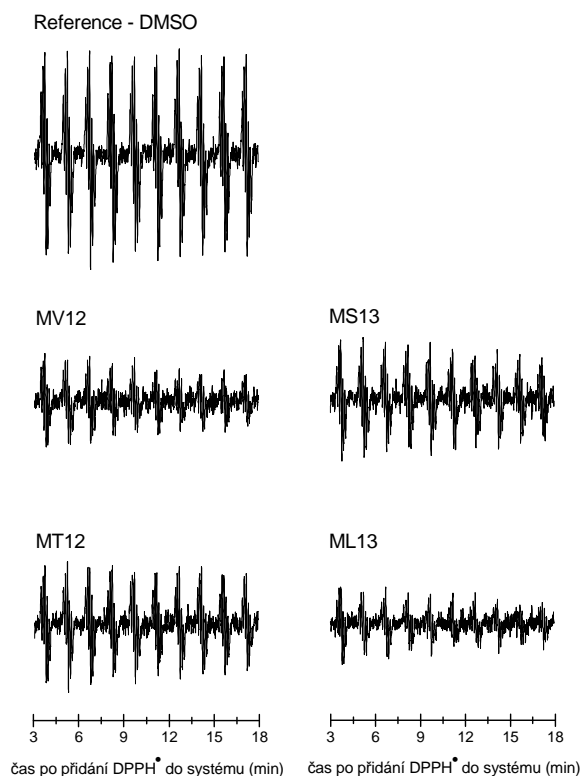
Z údajů prezentovaných na Obr. 37 je patrné, že radikál-zhášecí aktivita jednotlivých extraktů se mění v závislosti na odrůdě a roku produkce. Při porovnání jednotlivých roků sklizně je patrné, že nepatrně vyšší hodnoty $TEAC_{DPPH}$ byly stanoveny v odrůdách sklizených v roce 2012, přičemž pouze u vodných extraktů je tento rozdíl mezi roky 2012 a 2013 statisticky významný ($P_{H_2O} = 0,0302$).



Obr. 37: Hodnoty $TEAC_{DPPH}$ (mmol/kg) stanovené v ethanolových, vodných a DMSO extraktech muchovníku. Označení vzorků je uvedeno v Tab. 9.

Co se týká porovnání párových vzorků muchovníků (Tišnovský velkoplodý, Thiessen, Lamarckii Balerina), z výsledků měření je zřejmá značná variabilita hodnot $TEAC_{DPPH}$. Zatímco $\cdot DPPH$ radikál-zhášející aktivita ethanolových a vodných extraktů odrůdy Tišnovský velkoplodý 2013 byla nepatrně vyšší než u téže odrůdy z roku 2012, u DMSO extraktů byl pozorován opačný trend. Naopak hodnoty $TEAC_{DPPH}$ stanovené v extraktech odrůdy Thiessen 2012 byly vyšší než v odrůdě Thiessen 2013, bez ohledu na typ použitého rozpouštědla. Naproti tomu schopnost ethanolových a vodných extraktů odrůdy Lamarckii Balerina 2012 terminovat radikál $\cdot DPPH$ byla vyšší než u Lamarckii Balerina 2013, výjimkou byly opět DMSO extrakty, u kterých byla situace opačná.

Na Obr. 38 jsou znázorněny průběhy EPR spekter v závislosti od času po přidání volného radikálu $\cdot DPPH$ do systému obsahujícího DMSO (reference), resp. DMSO extrakty vybraných odrůd muchovníku. Podle očekávání přidavek radikálu $\cdot DPPH$ k extraktům muchovníku vede k okamžitému snížení intenzity EPR spektra v porovnání s referencí, u které zůstává signál stabilní. Z prezentovaných průběhů spekter jsou zřejmé rozdíly jak mezi jednotlivými odrůdami, tak i produkčními roky. Odrůdy Thiessen 2012 a Tišnovský školský 2013 vykazovaly nižší schopnost zhášet radikál $\cdot DPPH$ v porovnání s odrůdami Tišnovský velkoplodý 2012 a Lamarckii Balerina 2013, jejichž $\cdot DPPH$ radikál-zhášející aktivita byla porovnatelná.



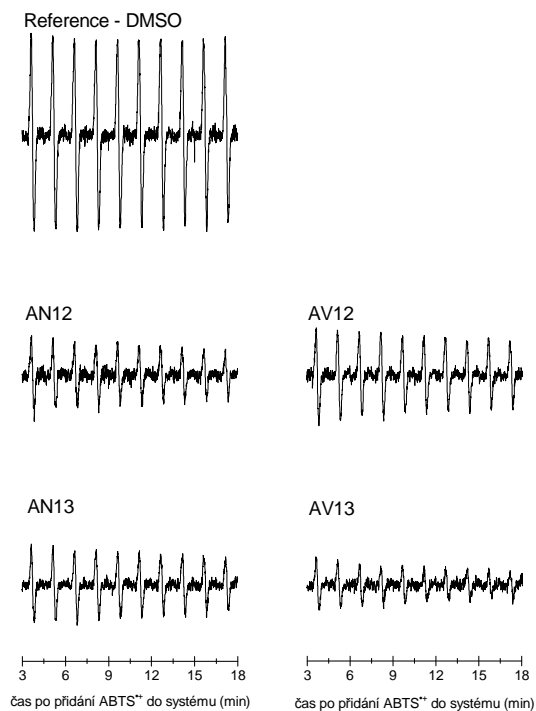
Obr. 38: Časový vývoj EPR spekter (šířka pole, $SW=10$ mT) naměřený v systému obsahujícím DMSO (reference), resp. vybrané DMSO extrakty muchovníků v přítomnosti radikálu \cdot DPPH ($c_{0(\cdot\text{DPPH})}=1\cdot 10^{-4}$ mol/dm³). Označení vzorků je uvedeno v Tab. 9.

5.7 Stanovení ABTS^{•+} radikál-zhášecí aktivity plodů aronie a muchovníku

Schopnost extraktů aronie a muchovníků terminovat kation-radikál ABTS^{•+} byla monitorována pomocí EPR spektroskopie a výsledky byly vyjádřeny jako hodnoty TEAC_{ABTS^{•+}}.

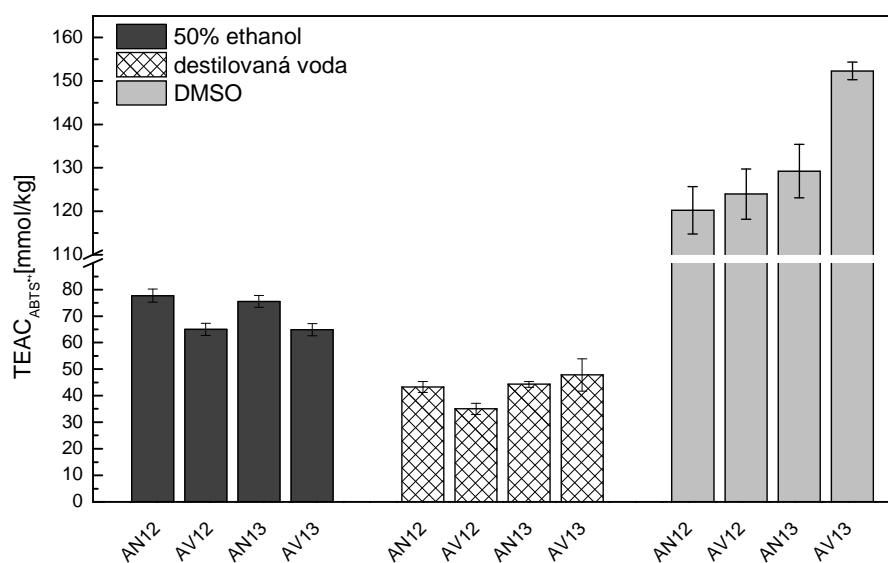
5.7.1 Vliv extrakčních podmínek na ABTS^{•+} radikál-zhášecí aktivitu aronie

Stejně jako v případě stanovení \cdot DPPH radikál-zhášecí aktivity, i v tomto případě je zřejmý okamžitý pokles intenzity EPR spektra po přidavku kation-radikálu ABTS^{•+} do systému obsahujícího příslušný extrakt aronie v porovnání s referenčním vzorkem (Obr. 39). Z prezentovaných časových průběhů EPR spekter je zřejmé, že pokles intenzity EPR spektra je nejvýraznější u odrůdy Viking 2013 v porovnání jak s odrůdou Viking 2012, tak i s odrůdou Nero, bez ohledu na rok produkce.



Obr. 39: Časový vývoj EPR spekter (šířka pole, $SW=10\text{ mT}$) naměřený v systému obsahujícím DMSO (reference), resp. příslušný DMSO extrakt aronie v přítomnosti kation-radikálu $ABTS^{\bullet+}$ ($c_{(ABTS^{\bullet+})}=1\cdot 10^{-4}\text{ mol/dm}^3$). Označení vzorků je uvedeno v Tab. 9.

Na Obr. 40 jsou znázorněny průměrné hodnoty $TEAC_{ABTS^{\bullet+}}$ extraktů aronie. Z grafu jsou patrné významné rozdíly mezi jednotlivými extrakčními činidly. Hodnoty $TEAC_{ABTS^{\bullet+}}$ stanovené v DMSO extraktech jsou přibližně o 45 % resp. 65 % vyšší v porovnání s ethanolovými a vodnými extrakty. Opět byl tedy potvrzen výborný extrakční potenciál DMSO. Výsledky navíc dobře korelují s pozorováním v případě DPPH testu a jsou v dobré shodě se stanovenými koncentracemi polyfenolů a anthokyanů.

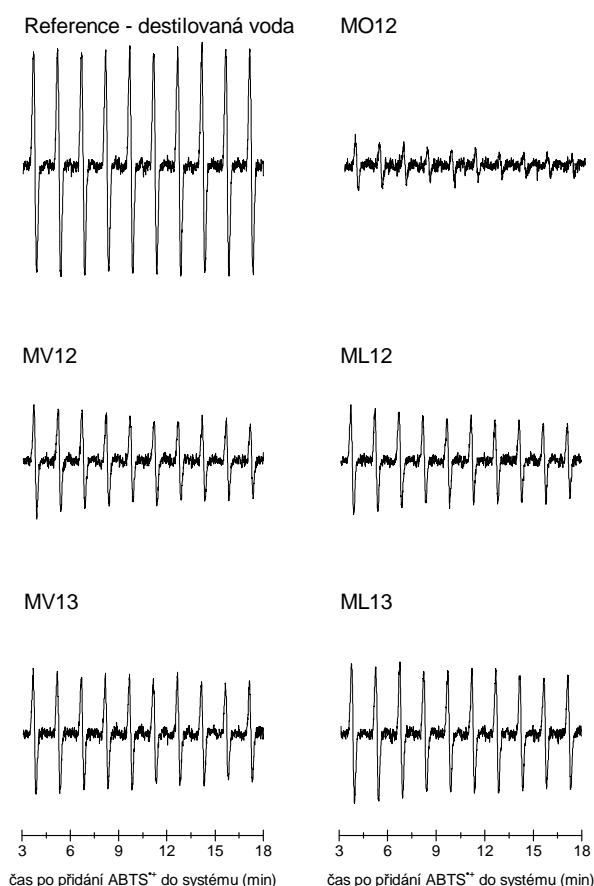


Obr. 40: Průměrné hodnoty $TEAC_{ABTS^{\bullet+}}$ (mmol/kg) stanovené v ethanolových, vodných a DMSO extraktech aronie. Označení vzorků je uvedeno v Tab. 9.

Z údajů prezentovaných na *Obr. 40* je také patrné, že hodnoty $TEAC_{ABTS^{*+}}$ stanovené pro ethanolové extrakty odrůdy Nero, bez ohledu na rok produkce, jsou vyšší než u odrůdy Viking ($P_{EtOH} = 0,0000$), avšak mezi jednotlivými roky produkce jsou rozdíly zanedbatelné. Naproti tomu u vodných extraktů nejsou zjevné výraznější rozdíly jak v rámci jednotlivých odrůd, tak ani produkčních roků. Stejně jako v případě hodnot $TEAC_{DPPH}$, nejvyšší hodnoty $TEAC_{ABTS^{*+}}$ v DMSO extraktech byly stanoveny v odrůdě Viking 2013, nejnižší pak v odrůdě Nero 2012. Z výsledků měření je také zřejmé, že výsledné hodnoty $TEAC_{ABTS^{*+}}$ velice dobře korelují s hodnotami $TEAC_{DPPH}$ ($P = 0,9876$).

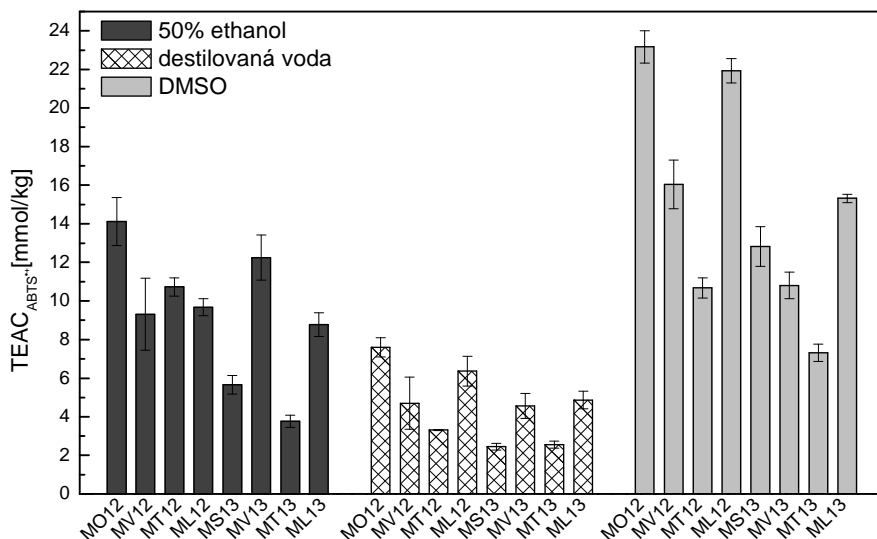
5.7.2 Vliv extrakčních podmínek na $ABTS^{*+}$ radikál-zhášecí aktivitu muchovníku

Z *Obr. 41* ilustrujícího časový vývoj EPR spekter naměřených v systému obsahujícím kation-radikál $ABTS^{*+}$ a vodu (reference), resp. vybraný vodný extrakt muchovníku, vyplývá, že přidavek $ABTS^{*+}$ k příslušnému extraktu vede k okamžitému poklesu intenzity EPR spektra v porovnání s referencí. Z průběhu spekter jsou zřejmé jak rozdíly mezi jednotlivými ročníky, tak i odrůdami. Obecně, odrůdy sklizené v roce 2012 vykazovaly vyšší $ABTS^{*+}$ radikál-zhášecí aktivitu než odrůdy z roku 2013, což potvrzují i průběhy spekter párových odrůd Tišnovský velkoplodý a Lamarckii Balerina. Nejvýraznější schopnost terminovat kation-radikál $ABTS^{*+}$ však byla pozorována u odrůdy Ostravský 2012.



Obr. 41: Časový vývoj EPR spekter (šířka pole, $SW=10$ mT) naměřený v systému obsahujícím vodu (reference), resp. vybrané vodné extrakty muchovníků v přítomnosti kation-radikálu $ABTS^{*+}$ ($c_{(ABTS^{*+})}=1 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³). Označení vzorků je uvedeno v Tab. 9.

Z údajů prezentovaných na *Obr. 42* vyplývá, že hodnoty $TEAC_{ABTS^{•+}}$ se liší v závislosti na volbě rozpouštědla. Podle očekávání, vyšší hodnoty $TEAC_{ABTS^{•+}}$ byly stanoveny v DMSO extraktech, zatímco nejnižší ve vodných extraktech. Stejně jako v případě hodnot $TEAC_{DPPH}$ se potvrdilo, že nejvyšší schopnost terminovat kation-radikál $ABTS^{•+}$ má odrůda Ostravský 2012, bez ohledu na rozpouštědlo. Naproti tomu, nejnižší hodnoty $TEAC_{ABTS^{•+}}$ byly stanoveny u ethanolových a DMSO extraktů odrůdy Thiessen 2013, zatímco u vodných extraktů byly nejnižší hodnoty $TEAC_{ABTS^{•+}}$ stanoveny nejen u odrůdy Thiessen 2013, ale i u odrůdy Tišnovský školský 2013.



Obr. 42: Průměrné hodnoty $TEAC_{ABTS^{•+}}$ (mmol/kg) stanovené v ethanolových, vodných a DMSO extraktech muchovníku. Označení vzorků je uvedeno v Tab. 9.

Z výsledků měření je také zřejmé, že hodnoty $TEAC_{ABTS^{•+}}$ se mění v rámci jednotlivých roků, resp. odrůd. Obecně, průměrné hodnoty $TEAC_{ABTS^{•+}}$ byly stanoveny u odrůd sklizených v roce 2012 v porovnání s rokem 2013, přičemž rozdíly mezi jednotlivými roky lze ze statistického hlediska považovat za významné ($P_{=EtOH}=0,0399$, $P_{H_2O}=0,0337$, $P_{DMSO}=0,0120$). Co se týká komparace jednotlivých odrůd, z výsledků měření je zřejmá značná variabilita. Porovná-li se párové vzorky, tj. stejné odrůdy s odlišným rokem sběru, z prezentovaných údajů vyplývá, že hodnoty $TEAC_{ABTS^{•+}}$ odrůd Thiessen 2012 a Lamarckii Balerina 2012 byly mírně vyšší než u odpovídajících protějšků, a to u všech rozpouštědel. Naproti tomu, u odrůdy Tišnovský velkoplodý byl pozorován nejednoznačný trend. Avšak z hlediska globálního statistického zhodnocení, lze pozorované rozdíly ve většině případů označit za statisticky nevýznamné ($P > 0,05$).

5.8 Statistické zhodnocení výsledků

Statistické srovnání výsledků bylo realizováno průběžně pro všechny experimentální systémy a všechna rozpouštědla. V této části práce jsou uvedeny některé společné závěry statistické analýzy, vyplývající ze zpracování dat jak metodami klasické, tak vícerozměrné statistiky s cílem poukázat na významnost rozdílů mezi jednotlivými parametry, jako i vliv některých faktorů (rok produkce, druh ovoce, odrůda, rozpouštědlo) na hodnoty naměřených experimentálních charakteristik. Mimo jiné, jsme se pokusili pomocí vícerozměrné statistiky některé vlastnosti studovaných systémů zobrazit.

5.8.1 Statistické porovnání ethanolových extraktů aronie a muchovníků

Statisticky významné deskriptory antioxidační aktivity pro komparaci aronie a muchovníku – analýza ANOVA

Za účelem zjištění statisticky významných deskriptorů antioxidační aktivity pro identifikaci a odlišení analyzovaných plodů aronie a muchovníků byly naměřené parametry ethanolových extraktů podrobeny statistickému porovnání metodou ANOVA, procedura Tukey-HSD, která umožňuje provádět vícenásobné porovnávání středních hodnot. Pro porovnání skupinových průměrů byly jako faktory použity: rok produkce, druh a odrůda. Za statisticky významné byly považovány rozdíly s hodnotou $P < 0,05$.

Tabulka 14: Statisticky významné rozdíly antioxidačních deskriptorů mezi ethanolovými extrakty aronie a muchovníků ($P < 0,05$)

Parametr	Porovnávaná skupina	Rozdíl mezi skupinami	Standardní chyba	Pravděpodobnost $P < 0,05$
Aronie (A) vs. muchovník (M) (zahrnuje roky produkce a všechny odrůdy)				
TPC	A–M	10,4239	0,3794	0,0000
TAC	A–M	3583,6334	190,4434	0,0000
L*	M–A	5,2347	0,3209	0,0000
a*	A–M	7,8059	0,5889	0,0000
b*	M–A	2,7726	0,2685	0,0000
chromaticita	A–M	7,1662	0,6070	0,0000
úhel bar. odstínu	A–M	301,1662	7,4957	0,0000
FRAP	A–M	0,1757	0,0401	0,0002
TEAC _{DPPH}	A–M	59,3143	1,2296	0,0000
TEAC _{ABTS^{•+}}	A–M	61,4950	1,9675	0,0000
Nero (AN) vs. Viking (AV) (zahrnuje všechny roky produkce)				
TEAC _{ABTS^{•+}}	AN–AV	11,6828	1,5596	0,0000

Při porovnání druhů ovoce (aronie vs. muchovník), *Tabulka 14*, v nichž byly zahrnuty roky produkce a jednotlivé odrůdy, byly v souladu s očekáváním zjištěny statisticky významné rozdíly, a to ve všech sledovaných parametrech. V 8 parametrech z 10 byly kvantitativně vyšší hodnoty zjištěny u aronie, pouze u složky světlosti L* a chromatické

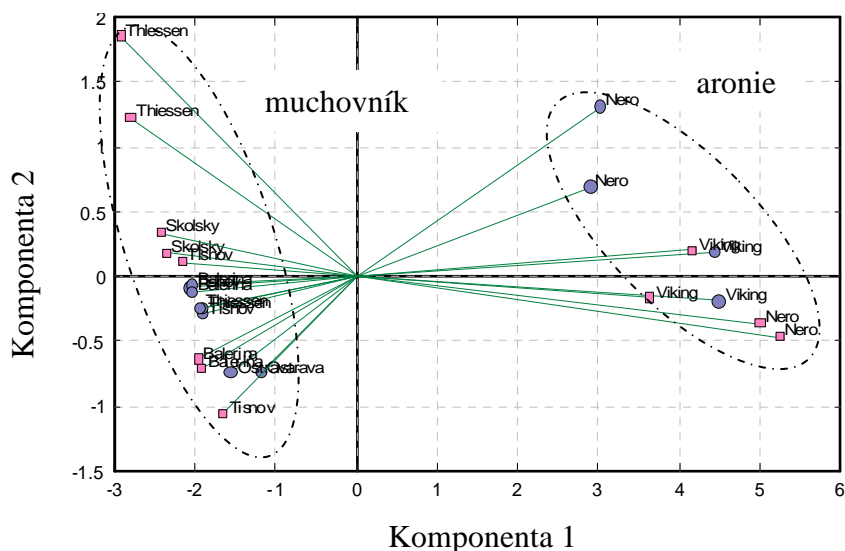
složky b* byly zaznamenány vyšší hodnoty u muchovníku (do úvahy nebyl brán obsah kyseliny askorbové).

Porovnáním jednotlivých odrůd aronie a muchovníků zvláště pro každý druh ovoce, byly zjištěny statistické rozdíly u odrůd aronie pouze v $TEAC_{ABTS^{•+}}$, kdy u odrůdy Nero byly naměřeny vyšší hodnoty než u odrůdy Viking. U odrůd muchovníku (data nejsou prezentována) byly zaznamenány statisticky významné rozdíly u parametrů TAC, L*, a*, $TEAC_{DPPH}$ a $TEAC_{ABTS^{•+}}$, přičemž rozdíly byly pozorovány především mezi odrůdou Ostravský a zbývajícími odrůdami. Ve většině případů byly vyšší hodnoty stanoveny v odrůdě Ostravský, výjimkou byl pouze parametr L*, kde byl pozorován opačný trend. Co se týká porovnání roků produkce, bez ohledu na druh ovoce, u žádného parametru nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly.

Diferenciace aronie a muchovníků – vícerozměrná analýza

Vzhledem k velké variabilitě dat, většímu počtu vzorků a paralelně sledovaných parametrů byly naměřené charakteristiky statisticky zpracovány pomocí multivariační analýzy. Analýza hlavních komponent byla použita za účelem grafického vyjádření rozdílů mezi ethanolovými extrakty aronie a muchovníků bez ohledu na jakýkoli faktor (druh ovoce, odrůda, rok produkce) a metody diskriminační analýzy za účelem tyto rozdíly i kvantifikovat.

Výsledky PCA analýzy ethanolových extraktů za použití všech 10 experimentálně sledovaných parametrů pro konstrukci komponent jsou znázorněny na Obr. 43. Je zřejmé, že vlastní vektory odpovídající jednotlivým vzorkům jsou diferencovány do dvou základních skupin podle druhu ovoce (aronie vs. muchovník), což ukazuje silné druhové a odrůdové rozdíly. Mimoto jsou zřejmé i vlivy roku produkce a v malé míře i odrůdové rozdíly.



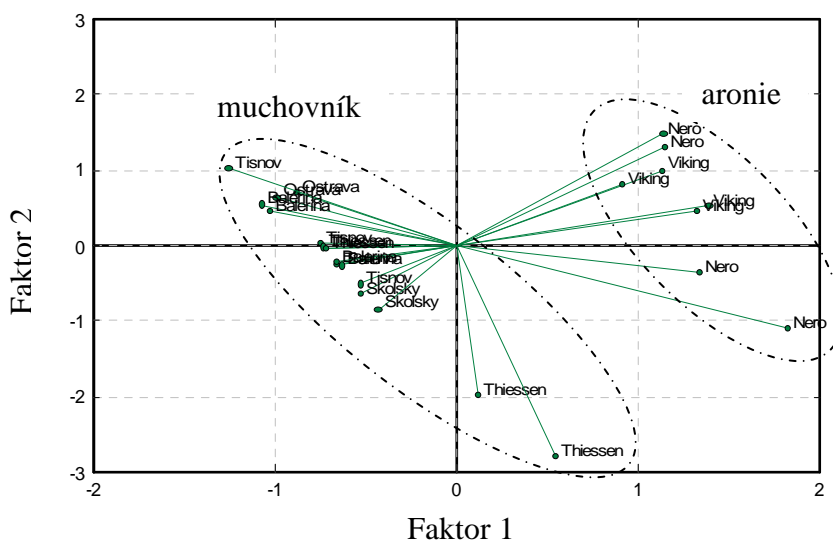
Obr. 43: Diferenciace ethanolových extraktů aronie a muchovníků metodou PCA za použití všech 10 experimentálně sledovaných parametrů pro konstrukci komponent. Analýza byla uskutečněna bez ohledu na druh ovoce nebo odrůdu. Odlišné barvy vektorů odpovídají odlišným ročníkům produkce.

Z analýzy vlastních vektorů vyplývá, že první komponenta, bez ohledu na charakteristiky vzorků (rok produkce, druh, odrůda), uspokojivě vysvětluje přibližně 92 % celkové variability systému, přičemž první tři komponenty kumulativně vysvětlují prakticky 99 % celkové

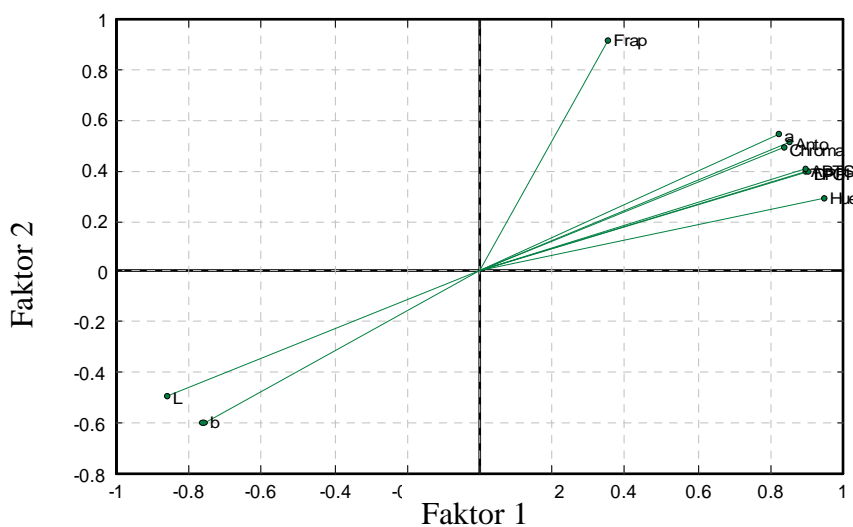
variability systému. Pro konstrukci první hlavní komponenty/popis variability se ukázaly být nejdůležitějšími parametry TPC, TAC, L*, a*, chromaticita, TEAC_{DPPH} a TEAC_{ABTS}⁺⁺, což naznačuje významnost prakticky všech sledovaných parametrů. V druhé hlavní komponentě byla prokázána klíčová role hodnot FRAP a úhlu barevného odstínu, ve třetí komponentě zase hodnoty chromaticity.

Faktorovou analýzou byla prostudovaná vzájemná korelační schopnost všech parametrů a vzorků. Prvním krokem faktorové analýzy je realizace analýzy hlavních komponent, která je zobrazená jako graf faktorů (Obr. 44). Oba diagramy – tj. Obr. 43 a Obr. 44a) jsou si podobné a jejich interpretace je prakticky identická. I z Obr. 44a) jsou patrné dominující rozdíly mezi jednotlivými druhy ovoce jako základní diferenciální faktor. Z grafu faktorových skóre (Obr. 44b) je zřejmé, které z parametrů ethanolových extraktů aronie a muchovníků vzájemně korelují a které nikoli. Obecně, čím blíže se v prostoru vektory odpovídající jednotlivým parametrům nacházejí, tím je jejich vzájemná korelace (a zastupitelnost při diskriminaci) vyšší.

a)



b)

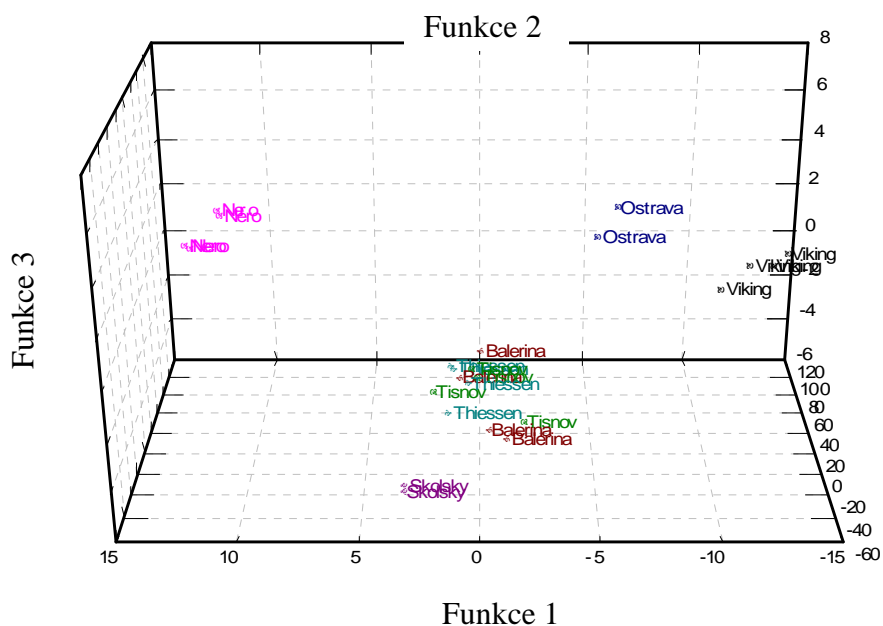


Obr. 44: Graf faktorových skóre (a) a graf faktorů (b) pro ethanolové extrakty aronie a muchovníků konstruované pomocí faktorové analýzy (PCF) v rotaci Varimax za použití 10 experimentálně stanovených parametrů

Konkrétně u parametrů TPC, TAC, a^* , chromaticity, $TEAC_{DPPH}$ a $TEAC_{ABTS^{•+}}$ je vidět vzájemná korelace. Nadruhou stranu tyto parametry nekorelují např. s parametry L^* a b^* , které samostatně mezi sebou korelují. V případě odlišení vzorků aronie a muchovníku je tedy vhodným parametrem hodnota FRAP .

Při diskriminaci ethanolových extraktů aronie a muchovníku pomocí kanonické diskriminační analýzy podle roku produkce (2012 vs. 2013), podle druhu ovoce (aronie vs. muchovník) a/nebo podle jednotlivých odrůd, byly všechny vzorky správně zařazeny do dané skupiny. V případě klasifikace vzorků podle roku produkce měly nejvyšší diskriminační váhu parametry L^* , a^* a chromaticita, u klasifikace podle druhu pak parametry a^* , b^* , chromaticita a úhel barevného odstínu a u klasifikace podle jednotlivých odrůd parametry $TEAC_{DPPH}$, $TEAC_{ABTS^{•+}}$ a úhel barevného odstínu.

Na Obr. 45 jsou znázorněny výsledky CDA pro ethanolové extrakty, přičemž analyzovaná data byla diskriminována a klasifikována podle odrůd bez ohledu na ovoce a rok produkce. Z prezentovaných výsledků jsou značné rozdíly mezi studovanými odrůdami (zejména odrůdami aronie Nero a Viking a odrůdami muchovníku Ostravský a Tišnovský školský), ale také lze vidět, že některé odrůdy muchovníku jsou si svými vlastnostmi dost podobné. Je však potřeba vzít v úvahu, že se zde jedná o 3D zobrazení mnohem více rozměrného systému, a tedy je zde nutně přítomná určitá „deformace zobrazení“ - při jiném úhlu zobrazení se rozložení jednotlivých skupin v prostoru může jevit odlišně a je na uživateli, jaké zobrazení zvolí za kompromis s cílem data vizualizovat. Z prezentovaného obrázku je zřejmá i rozdílnost/podobnost vlastností vzorků odpovídajících různým rokům produkce. Obzvláště viditelný je tento vliv u odrůd muchovníku Balerina a Thiessen.



Obr. 45: Kanonická diskriminační analýza ethanolových extraktů aronie a muchovníků podle odrůdové skladby. Na diskriminaci byly využity všechny experimentálně zjištěné charakteristiky jednotlivých vzorků stanovené v daném rozpouštědle s výjimkou obsahu kyseliny askorbové.

Pro účely diferenciacie a klasifikace ethanolových extraktů aronie a muchovníků byla také použita metoda k-tého nejbližšího souseda (*Tabulka 15*). Pomocí této metody byly jednotlivé druhy ovoce rozlišeny se 100% správností pro $k=1$ i $k=2$; při klasifikaci podle roku produkce byly také klasifikovány jednotlivé vzorky se 100% správností pro oba přístupy. Při klasifikaci vzorků podle odrůd byla pro $k=1$ dosažena 100% správnost klasifikace, ale při $k=2$ klesla správnost zařazení na 95,83%, kdy byla zařazena odrůda Viking v jednom případě do skupiny pro odrůdu Nero, s pravděpodobností 50 %.

Tabulka 15: Klasifikační skóre ethanolových extraktů aronie a muchovníků pomocí metod kanonické diskriminační analýzy a metody k-tého nejbližšího souseda pro různá klasifikační kritéria

Metoda	Klasifikační kritérium		
	rok produkce	druh ovoce	odrůda
CDA	100 %	100 %	100 %
k-tý nejbližší soused $k=1$	100 %	100 %	100 %
$k=2$	100 %	100 %	95,83 %

Výsledky statistické analýzy jednoznačně potvrdily, že vlastnosti ethanolových extraktů aronie a muchovníku jsou ovlivňovány několika faktory a to druhovou i odrůdovou skladbou a také ročníkem produkce. Zjištěné rozdíly mezi jednotlivými vzorky aronie a muchovníku jsou dostatečné pro rozlišení a klasifikaci plodů podle roku produkce, druhu i jednotlivých odrůd na základě zvolených experimentálních charakteristik. Je vhodné poznamenat, že vlastnosti vzorků jsou v daném rozpouštědlu dominantně ovlivněny druhově-odrůdovou diverzitou.

5.8.2 Statistické porovnání vodných extraktů aronie a muchovníků

Statisticky významné deskriptory antioxidační aktivity pro komparaci aronie a muchovníku - analýza ANOVA

Výsledky analýzy ANOVA vodných extraktů aronie a muchovníků jsou uvedeny v *Tabulce 16*. Hodnotila se signifikantnost rozdílů ($P < 0,05$) jednotlivých experimentálních charakteristik pro následující kritéria: roky produkce (rok 2012 vs. 2013), druh ovoce (aronie vs. muchovník) a odrůda příslušného ovoce. V souladu s očekáváním, významné rozdíly mezi parametry byly zaznamenány pro jednotlivé druhy ovoce (aronie vs. muchovník). Z *Tabulky 16* vyplývá, že většina sledovaných deskriptorů antioxidační aktivity byla vyšší u aronie, s výjimkou parametrů barevnosti L^* a b^* a v úhlu barevného odstínu. Toto srovnání je však k výrazným druhově-odrůdovým rozdílům obou druhů ovoce jen informativní.

Pokud jde o rozdíly mezi roky produkce 2012 a 2013, u žádného parametru nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly. Co se týká porovnání jednotlivých odrůd, zvláště pro aronii a zvláště pro muchovník, mezi odrůdami aronie Nero a Viking nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly, zatímco mezi jednotlivými odrůdami muchovníků (data nejsou prezentována) se projevíly statisticky významné rozdíly v parametrech TPC, TAC, L^* , úhel barevného odstínu, FRAP a $TEAC_{DPPH/ABTS^{•+}}$, přičemž pozorované trendy byly podobné jako u ethanolových extraktů.

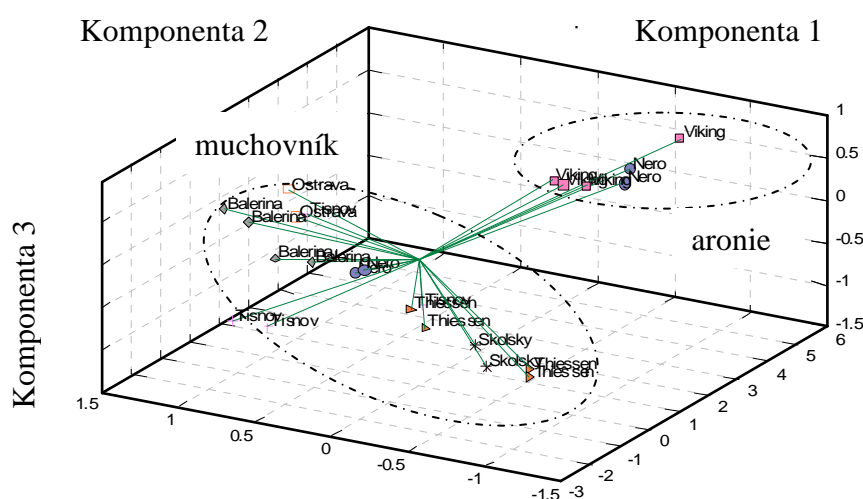
Tabulka 16: Statisticky významné rozdíly antioxidačních deskriptorů mezi vodnými extrakty aronie a muchovníků ($P < 0,05$). Zápis X-Y značí, že sledovaný parametr je $X > Y$

Parametr	Porovnávaná skupina	Rozdíl mezi skupinami	Standardní chyba	Pravděpodobnost $P < 0,05$
Aronie (A) vs. muchovník (M)				
(zahrnuje všechny roky produkce a odrůdy)				
TPC	A–M	6,2586	0,3074	0,0000
TAC	A–M	1 991,0116	63,5943	0,0000
L*	M–A	3,9545	0,3269	0,0000
a*	A–M	8,5247	0,6894	0,0000
b*	M–A	2,1582	0,1960	0,0000
chromaticita	A–M	6,3370	0,7155	0,0000
úhel bar. odstínu	M–A	80,9615	1,3946	0,0000
FRAP	A–M	0,2404	0,0535	0,0002
TEAC _{DPPH}	A–M	38,6185	1,1807	0,0000
TEAC _{ABTS^{•+}}	A–M	38,0525	1,5513	0,0000

Diferenciace aronie a muchovníků – vícerozměrná analýza

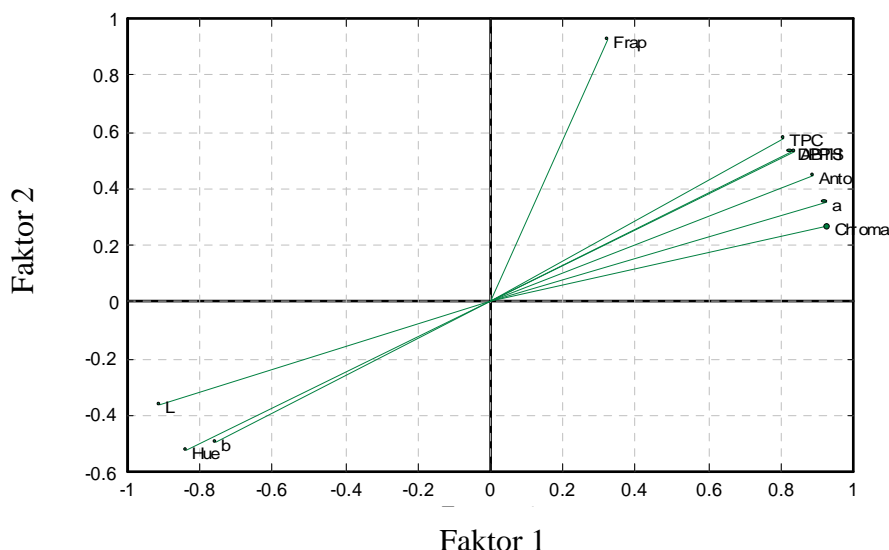
Analýzou hlavních komponent se i u vodných extraktů prokázala významná diferenční schopnost druhu ovoce – na Obr. 46 jsou zřetelné dvě hlavní skupiny vektorů příslušející extraktům aronie, resp. muchovníku. Z grafu hlavních komponent jsou patrné i ročníkové rozdíly mezi jednotlivými odrůdami aronie a muchovníků.

Z výsledků PCA vyplývá, že první tři komponenty kumulativně vysvětlují 98,5 % celkové variability systému a největší váhu mají v první komponentě parametry TAC, úhel barevného odstínu a TEAC_{ABTS^{•+}}. Pro konstrukci druhé a třetí komponenty byly s nejvyšší váhou využity hodnoty FRAP resp. barevného parametru b*.



Obr. 46: Diferenciace vodných extraktů aronie a muchovníků metodou PCA za použití všech 10 experimentálně sledovaných parametrů pro konstrukci komponent. Analýza byla uskutečněna bez ohledu na druh ovoce nebo ročník produkce. Odlišné barvy vektorů odpovídají odlišným odrůdám aronie, resp. muchovníku.

Z faktorové analýzy vyplývá existence tří základních skupin vektorů které uvnitř skupin vzájemně korelují, ale meziskupinové korelace jsou nízké (Obr. 47). Parametry TPC, TAC, a^* , chromaticita, $TEAC_{DPPH}$ a $TEAC_{ABTS}$ vzájemně korelují. Dále lze vidět vzájemnou korelaci mezi parametry L^* , b^* a úhlem barevného odstínu. Na druhou stranu je zřejmé, že např. parametry TPC, TAC, $TEAC_{DPPH}$ nekorelují s parametry L^* , b^* . Hodnoty FRAP s ostatními parametry prakticky nekorelují. Je možné očekávat, že parametry FRAP, resp. některý z parametrů L^* , b^* nebo úhlu barevného odstínu je možné efektivně využít pro účely vzájemné diference.



Obr. 47: Graf faktorů - faktorová analýza s rotací Varimax- pro vodné extrakty aronie a muchovníků zkonstruovaný za použití všech 10 experimentálně sledovaných charakteristik.

Výsledky kanonické diskriminační analýzy vodných extraktů aronie a muchovníku podle zvolených kritérií a klasifikace vzorků metodou k-tého nejbližšího souseda jsou uvedeny v Tab. 17.

Tabulka 17: Klasifikační skóre vodných extraktů aronie a muchovníků pomocí metod kanonické diskriminační analýzy a metody k-tého nejbližšího souseda pro různá klasifikační kritéria

Metoda	Klasifikační kritérium		
	rok produkce	druh	odrůda
CDA	95,83 %	100 %	87,50 %
K-tý nejbližší soused	$K=1$	100 %	100 %
	$K=2$	91,67 %	70,83 %

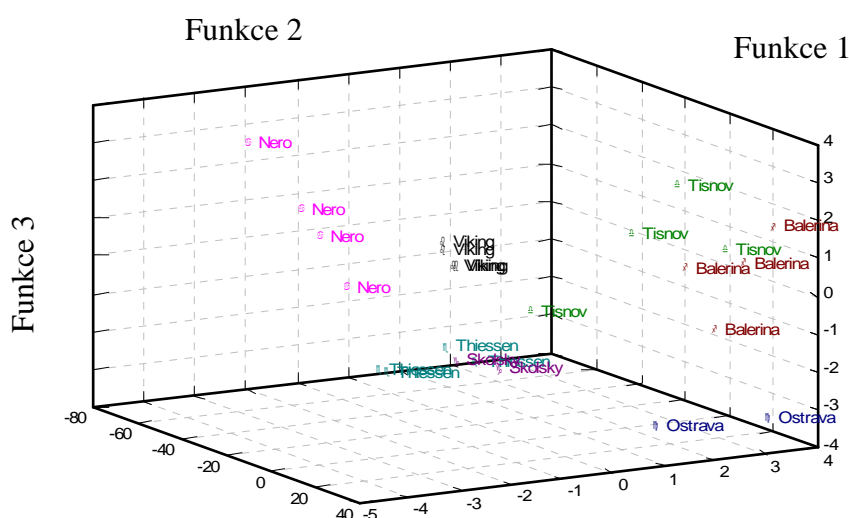
Při diskriminaci vodných extraktů pomocí CDA podle roku produkce bylo 95,83 % vzorků správně zařazeno, pouze odrůda Nero z r. 2013 byla zařazena do roku 2012. Z hodnot diskriminačních koeficientů vyplývá, že při diskriminaci se jako parametr s nejvyšší diskriminační silou využil parametr L^* a také a^* a hodnoty $TEAC_{DPPH}$.

V případě diskriminace podle odrůdy bylo 87,50 % případů z celkem 24 správně zařazeno, špatně byly zařazeny odrůdy Tišnovský velkoplodý (jako odrůda Ostravský resp. Lamarckii Balerina) a Lamarckii Balerina (klasifikován jako Tišnovský velkoplodý).

Při diskriminaci podle druhu ovoce byly (v souladu s očekáváním) všechny vzorky správně zařazeny do dané skupiny.

Z grafu diskriminačního skóre (Obr. 48) jsou zřejmé druhové rozdíly (aronie vs. muchovník) a jsou patrné i rozdíly mezi odrůdami aronie (Nero, Viking), a mezi odrůdami muchovníku Ostravský a Thiessen. Na druhou stranu, jsou patrné určité podobnosti u odrůd Thiessen a Tišnovský školský.

Pro účely diferenciaci a klasifikace vodných extraktů aronie a muchovníků byla také použita metoda k-tého nejbližšího souseda, která rozlišila jednotlivé druhy ovoce se 100% správností pro $k=1$ i $k=2$ (Tabulka 17). Při klasifikaci podle roku produkce byly také odděleny jednotlivé vzorky se 100% správností pro $k=1$. Pro $k=2$ správnost zařazení klesla na 91,67 % z důvodu špatné klasifikace odrůdy muchovníku Tišnovský velkoplodý, kdy byly obě vzorky produkce 2013 klasifikovány do roku 2012. Jednotlivé odrůdy byly také odlišeny pro $k=1$ se 100%, při $k=2$ však klesla správnost zařazení na 70,83 %, kdy špatně byla zařazena odrůda Viking, Thiessen, Lamarckii Balerina.



Obr. 48: Kanonická diskriminační analýza vodných extraktů aronie a muchovníků podle odrůdové skladby. Na diskriminaci byly využity všechny experimentálně zjištěné charakteristiky jednotlivých vzorků stanovené v daném rozpouštědle s výjimkou obsahu kyseliny askorbové.

Z výsledků analýzy vyplývají podobné trendy jako u ethanolových extraktů. Analýzy potvrzují, že pro rozlišení studovaných vzorků jsou nejvýznamnějšími faktory: druh ovoce a odrůdová skladba.

5.8.3 Statistické porovnání extraktů aronie a muchovníků v DMSO

Statisticky významné deskriptory antioxidační aktivity pro komparaci aronie a muchovníku – analýza ANOVA

V *Tabulce 18* jsou shrnuty výsledky analýzy ANOVA, zaměřené na hledání významných rozdílů mezi extrakty aronie a muchovníků v DMSO. Zatímco u ethanolových a vodných extraktů nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými roky produkce, v případě DMSO extraktů byly zjištěny statisticky významné rozdíly v parametrech L*, a* a v úhlu barevného odstínu, přičemž hodnoty světlosti L* a úhlu barevného odstínu byly vyšší ve vzorcích z roku 2013 než v roce 2012, naopak chromatická a* byla vyšší v roce 2012.

V případě komparace aronie a muchovníku se ukázaly signifikantní druhové rozdíly ve všech parametrech kromě úhlu barevného odstínu. U všech parametrů se zjistily kvantitativně vyšší hodnoty těchto ukazovatelů u aronie, výjimkou byly hodnota L* vyšší u muchovníku.

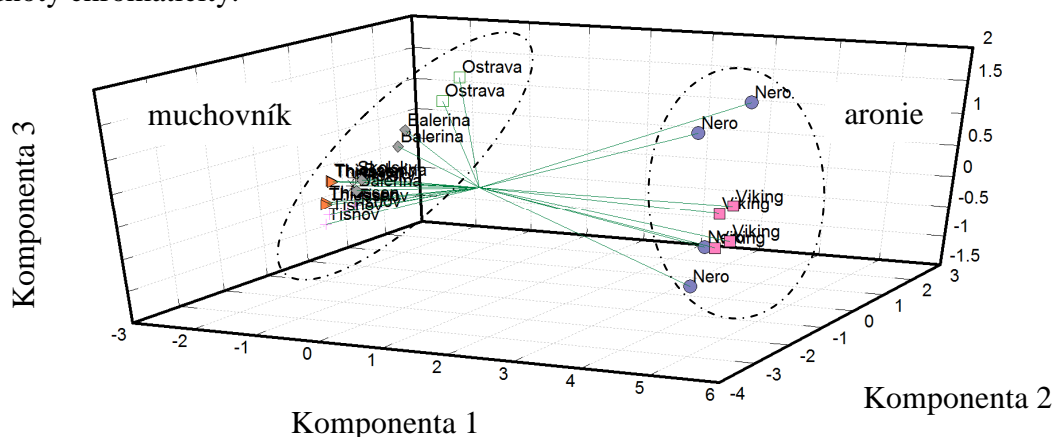
V případě porovnání jednotlivých odrůd aronie se projevily významné rozdíly v hodnotách TAC a chromaticitě. Naproti tomu, mezi jednotlivými odrůdami muchovníků byly zjištěny signifikantní rozdíly u všech sledovaných parametrů s výjimkou parametrů L*, a* a úhlu barevného odstínu. Většina rozdílů byla pozorována především mezi odrůdou Ostravský a zbývajícími odrůdami muchovníku.

Tabulka 18: Statisticky významné rozdíly antioxidačních deskriptorů mezi DMSO extrakty aronie a muchovníků ($P < 0,05$). Zápis X-Y značí, že sledovaný parametr je $X > Y$

Parametr	Porovnávaná skupina	Rozdíl mezi skupinami	Standardní chyba	Pravděpodobnost $P < 0,05$
Rok 2012 (12) vs. 2013 (13) (zahrnuje všechny druhy, odrůdy)				
L*	13–12	0,6942	0,3127	0,0370
a*	12–13	0,4161	0,1869	0,0366
úhel bar. odstínu	13–12	15,3213	4,1038	0,0012
Aronie (A) vs. muchovník (M) (zahrnuje všechny roky produkce, odrůdy)				
TPC	A–M	18,9925	0,6988	0,0000
TAC	A–M	4 546,6394	326,3404	0,0000
L*	M–A	1,0643	0,2883	0,0013
a*	A–M	0,5046	0,1912	0,0150
b*	A–M	0,9532	0,1621	0,0000
chromaticita	A–M	1,1170	0,1781	0,0000
FRAP	A–M	3,4032	0,1326	0,0000
TEAC _{DPPH}	A–M	102,7937	2,9598	0,0000
TEAC _{ABTS+}	A–M	116,5969	3,9374	0,0000
Nero (AN) vs. Viking (AV) (zahrnuje roky produkce)				
TAC	AV–AN	139,9118	22,8772	0,0000
chromaticita	AN–AV	0,6157	0,1753	0,0348

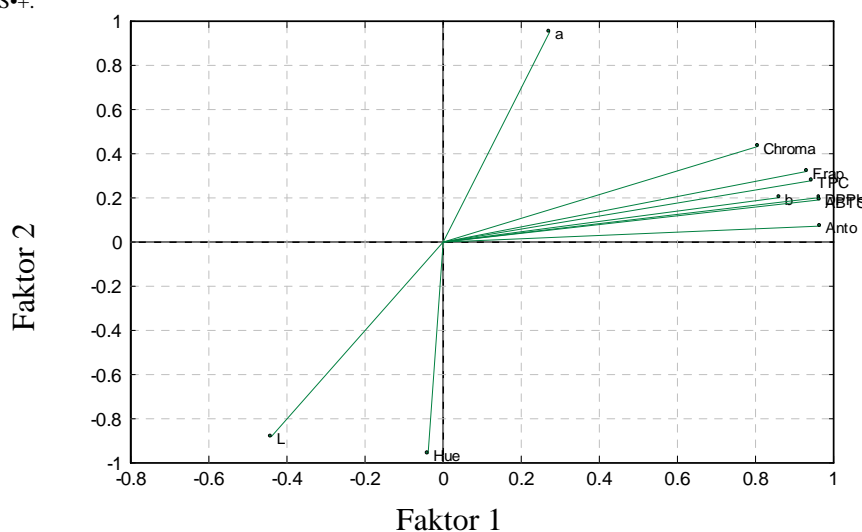
Diferenciace aronie a muchovníků – vícerozměrná analýza

Obr. 49 znázorňuje výsledky PCA analýzy DMSO extraktů, kdy faktorem byla zvolena odrůdová skladba. Z grafu jsou patrné značné rozdíly mezi jednotlivými druhy ovoce, dále jsou viditelné i ročníkové rozdíly mezi jednotlivými odrůdami aronie a muchovníků. Odrůdové rozdíly se i v tomto případě ukazují jako nejvýraznější diferenciální faktor. První hlavní komponenta kumulativně vysvětluje 73,61 % celkové variability systému, druhá komponenta 19,43 % a třetí 5 % zůstávající variability, všechny tři komponenty spolu kumulativně vysvětlují 98 % zbývajících variability. Největší význam v první komponentě mají parametry TPC, FRAP, TEAC_{DPPH} a TEAC_{ABTS}^{•+}, u druhé komponenty poté složka světlosti L* a úhel barevného odstínu, ve třetí komponentě dominantní úlohu pro popis variability mají hodnoty chromaticity.

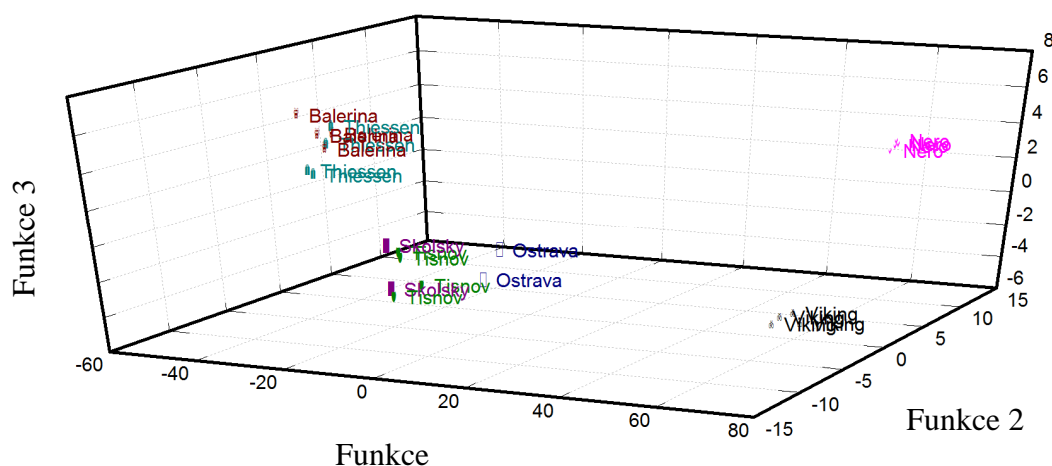


Obr. 49: Diferenciace extraktů aronie a muchovníků v DMSO metodou PCA za použití všech 10 experimentálně sledovaných parametrů. Odlišné barvy vektorů odpovídají odlišným odrůdám aronie, resp. muchovníku.

Z faktorové analýzy (Obr. 50) je zřejmé, že parametry L*, barevná koordináta a* a úhel barevného odstínu jsou důležitými parametry při diskriminaci jednotlivých vzorků. Z grafu je také patrná vzájemná korelace mezi parametry TPC, TAC, FRAP, b*, TEAC_{DPPH} a TEAC_{ABTS}^{•+}.



Obr. 50: Graf faktorů - faktorová analýza s rotací Varimax- pro DMSO extrakty aronie a muchovníků konstruovaný za použití všech 10 experimentálně sledovaných charakteristik.



Obr. 51: Kanonická diskriminační analýza extraktů aronie a muchovníků v DMSO podle odrůdové skladby. Na diskriminaci byly využity všechny experimentálně zjištěné charakteristiky jednotlivých vzorků stanovené v daném rozpouštědle s výjimkou obsahu kyseliny askorbové.

Při diskriminaci DMSO extraktů podle roku produkce, druhů ovoce i vybraných odrůd pomocí CDA bylo 100 % vzorků správně zařazeno do příslušné skupiny. Z výsledků diskriminace podle odrůdy (Obr. 51) jsou patrné rozdíly mezi odrůdami aronie (Nero, Viking), také jsou viditelné rozdíly mezi odrůdami muchovníku Ostravský a Thiessen nebo Tišnovský velkoplodý a Lamarckii Balerina. Nadruhou stranu jsou také patrné jisté podobnosti u odrůd Tišnovský velkoplodý, Tišnovský školský.

Metoda k-tého nejbližšího souseda, obdobně jako v ethanolových i vodných extraktech rozlišila i v případě extraktů v DMSO jednotlivé druhy ovoce se 100% správností pro $k=1$ i $k=2$ (Tabulka 19). Jednotlivé odrůdy byly také rozlišeny se 100% správností pro $k=1$ i $k=2$. Při klasifikaci podle roku produkce byly také zařazeny jednotlivé vzorky se 100% správností pro $k=1$; pro $k=2$ správnost zařazení klesla na 95,83 %, špatně byla zařazena odrůda Nero ročník 2013 jako ročník 2012.

Tabulka 19: Správnost rozlišení vzorků aronie a muchovníků pomocí metod kanonické diskriminační analýzy a metody k-tého nejbližšího souseda

Metoda	Klasifikační kritérium		
	rok produkce	druh	odrůda
CDA	100 %	100 %	100 %
k-tý nejbližší soused	$k=1$	100 %	100 %
	$k=2$	95,83 %	100 %

Z výsledků analýz DMSO extraktů aronie a muchovníku vyplývá, že vzorky aronie a muchovníků lze velmi dobře odlišit podle roků produkce, druhů ovoce i jednotlivých odrůd. Pro diskriminaci vzorků mají význam hlavně barevné charakteristiky: L*,a* a úhel barevného odstínu.

5.8.4 Statistické porovnání extrakční účinnosti všech tří rozpouštědel

Statisticky významné deskriptory antioxidační aktivity pro komparaci aronie a muchovníku – analýza ANOVA

Metodou ANOVA byly také zjišťovány vzájemné statisticky významné rozdíly při porovnání extrakční účinnosti jednotlivých rozpouštědel použitých při přípravě extraktů aronie a muchovníků. Z výsledků, které jsou shrnuty v *Tabulce 20*, je zřejmé, že u všech 10 sledovaných parametrů byly zjištěny statisticky významné rozdíly.

Tabulka 20: Statisticky významné rozdíly antioxidačních charakteristik extraktů aronie a muchovníků v jednotlivých rozpouštědlech ($P < 0,05$). Zápís X-Y značí, že sledovaný parametr je $X > Y$

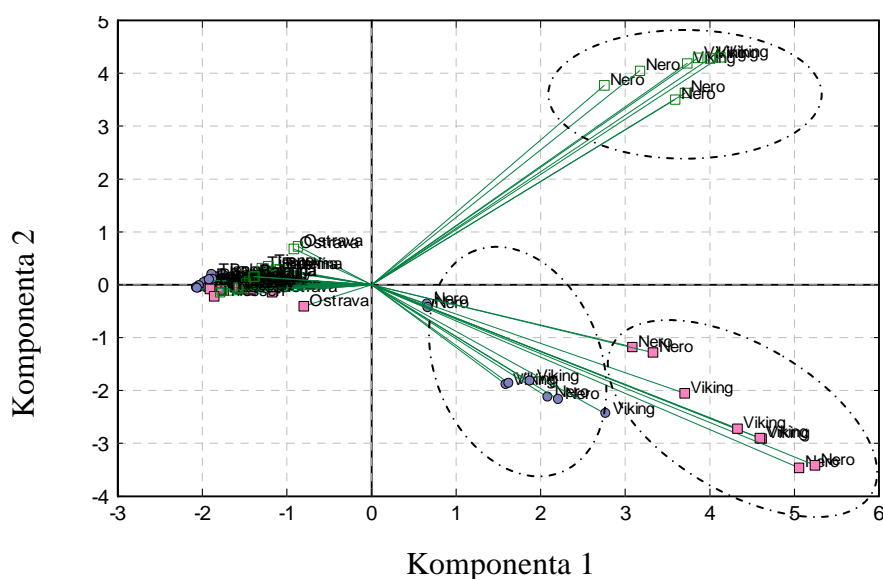
Parametr	Porovnávaná skupina	Rozdíl mezi skupinami	Standardní chyba	Pravděpodobnost $P < 0,05$
Rozpouštědlo 50% ethanol (E) vs. destilovaná voda (V) vs. DMSO (D) (zahrnuje všechny druhy, odrůdy a ročníky)				
TPC	D–V	5,8282	1,8381	0,0063
TAC	D–V	1 451,0343	512,0659	0,0164
L*	D–E	1,8975	0,5710	0,0040
a*	E–D	3,1592	0,9919	0,0061
	V–D	2,8529	0,9919	0,0146
b*	V–E	1,6308	0,3237	0,0000
	D–E	1,1418	0,3237	0,0021
chromaticita	V–D	3,3266	0,8525	0,0006
	E–D	2,5594	0,8525	0,0103
úhel bar. odstínu	E–V	92,6889	25,2798	0,0014
	E–D	68,6486	25,2798	0,0225
FRAP	D–V	1,2341	0,2798	0,0001
	D–E	1,1205	0,2798	0,0004
TEAC _{DPPH}	D–V	30,4968	10,0986	0,0098
TEAC _{ABTS^{•+}}	D–V	36,3879	11,1507	0,0000
Aronie (A) vs. muchovník (M) (zahrnuje všechny rozpouštědla, roky produkce a odrůdy)				
TPC	A–M	11,8916	0,9239	0,0000
TAC	A–M	3 373,7615	232,4659	0,0000
L*	M–A	3,4178	0,3388	0,0000
a*	A–M	5,6117	0,6384	0,0000
b*	M–A	1,3259	0,2870	0,0000
chromaticita	A–M	4,8734	0,5727	0,0000
úhel bar. odstínu	A–M	71,1283	22,3458	0,0022
FRAP	A–M	1,2731	0,2338	0,0000
TEAC _{DPPH}	A–M	66,9088	4,6581	0,0000
TEAC _{ABTS^{•+}}	A–M	72,0482	5,6928	0,0000

Ve většině případů (7 z 10), byly zjištěny vyšší hodnoty deskriptorů antioxidačních vlastností u DMSO. Z prezentovaných údajů je patrné, že u ethanolových extraktů byly zjištěny vyšší hodnoty chromatické složky a^* , chromaticity a úhlu barevného odstínu v porovnání s vodnými nebo DMSO extrakty. Tento výsledek je v dobré shodě s pozorovanými trendy uvedenými v předchozích částech práce, kdy extrakty v DMSO vykazovaly nejvyšších hodnot sledovaných experimentálních charakteristik prakticky ve všech případech.

Statisticky významné rozdíly v hodnotách jednotlivých parametrů byly také potvrzené při testu druhových rozdílů mezi aronií a muchovníkem. Podle očekávání, ve většině případů byla aronie charakterizována vyššími hodnotami sledovaných parametrů, s výjimkou parametrů L^* a b^* , které byly vyšší u muchovníku.

Diferenciace aronie a muchovníků – vícerozměrná analýza

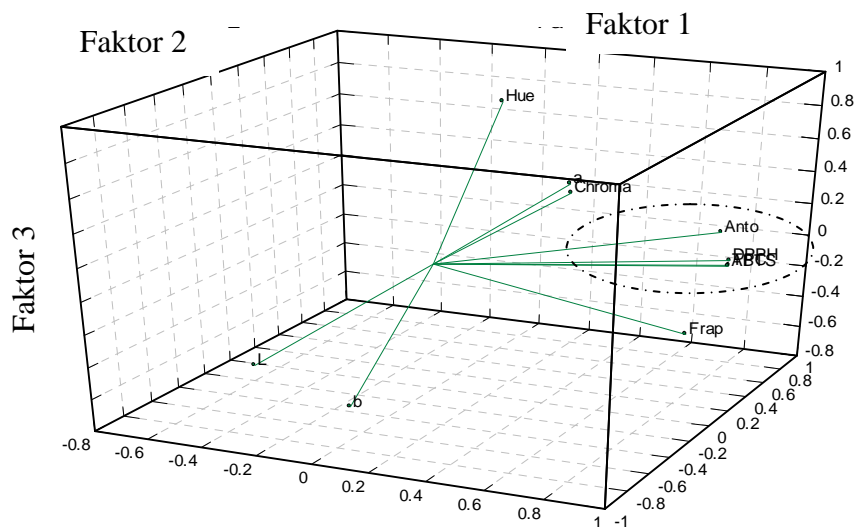
Výsledky analýzy hlavních komponent jsou znázorněny na Obr. 52. Z grafu hlavních komponent je patrná jednoznačná vzájemná diferenciace aronie a muchovníku, což potvrzuje, že druhová diferenciace je nejvýraznější. Z obrázku je patrná také sub-diferenciace extraktů aronie podle rozpouštědla – je možné vyčlenit 3 skupiny vlastních vektorů, přičemž v dobrém souladu s experimentálním pozorováním jsou podobné vlastnosti extraktů aronie v ethanolu a ve vodě a více odlišné vlastnosti extraktů tohoto ovoce v DMSO, pro které vlastní vektory jednotlivých parametrů leží v odlišném sektoru grafu hlavních komponent. V případě extraktů muchovníku taková jednoznačná sub-diferenciace podle rozpouštědel není patrná.



Obr. 52: Diferenciace extraktů aronie a muchovníků podle rozpouštědel metodou PCA za použití všech 10 experimentálně sledovaných parametrů pro konstrukci komponent. Analýza byla uskutečněna bez ohledu na druh ovoce nebo ročník produkce. Odlišné barvy vektorů odpovídají odlišným rozpouštědlům.

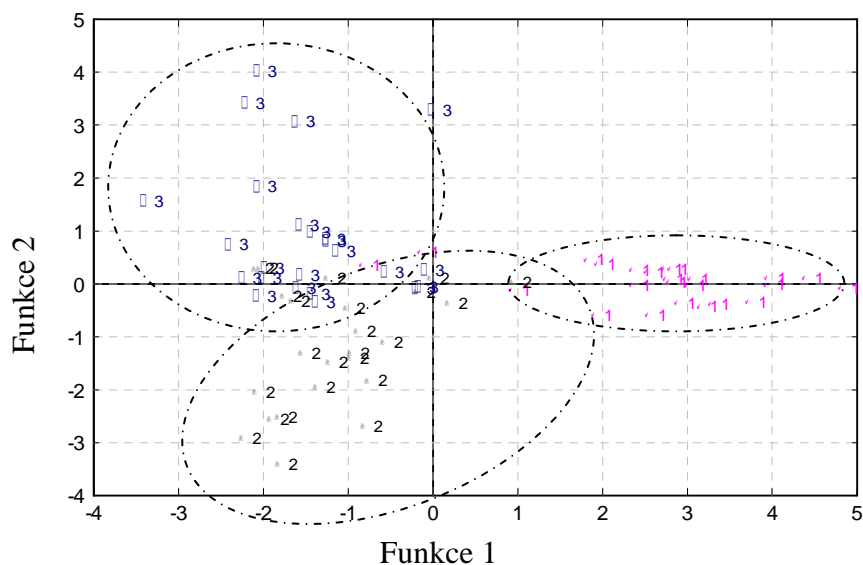
Z výsledků PCA analýzy vyplývá, že první tři hlavní komponenty kumulativně vysvětlují 95,44 % celkové variability systému. Z hlediska váhy jednotlivých parametrů pro konstrukci komponent se jako nejvýznamnější ukázaly být v 1. komponentě parametry TPC, TAC a TEAC_{DPPH}, zatímco u 2. komponenty parametry chromatické složky a^* , chromaticity a FRAP, u 3. pak úhel barevného odstínu.

Faktorová analýza s rotací Varimax (Obr. 53), ukazuje, že pro diferenciaci vzorků bez ohledu na druh použitého extrakčního činidla mají největší význam tři parametry, a to složka světlosti L^* , chromatická složka b^* a úhel barevného odstínu. Analýza faktorových skóre (data nejsou zobrazena) prokazuje diferenciaci faktorů obdobnou jako v případě PCA popsané výše. Vliv rozpouštědel je patrnější opět u extraktů aronie.



Obr. 53: Graf faktorů - faktorová analýza s rotací Varimax- pro extrakty aronie a muchovníků konstruovaný za použití všech 10 experimentálně sledovaných charakteristik bez ohledu na druh extrakčního činidla.

Výsledky kanonické diskriminační analýzy podle druhu rozpouštědla (Obr. 54) naznačují jen částečnou diskriminaci do 3 diskretních oblastí.



Obr. 54: Kanonická diskriminační analýza extraktů aronie a muchovníků v DMSO podle druhu extrakčního činidla. Na diskriminaci byly využity všechny experimentálně zjištěné charakteristiky jednotlivých vzorků stanovené v daném rozpouštědle s výjimkou obsahu kyseliny askorbové (1–destilovaná voda, 2–50% ethanol, 3–DMSO)

Je patrné, že největší mírou se odlišují vodné extrakty od ethanolových a DMSO extraktů, i když všechny tři typy extraktů jsou navzájem také odlišné – skupiny parametrů leží v navzájem odlišných sektorech grafu diskriminačních skóre. Na druhou stranu z grafu je zřejmé, že část vzorků je si bez ohledu na rozpouštědlo podobná, což je dáno poměrně velkým statistickým souborem dat (vzorků i charakteristik). Dané výsledky dobře korelují s odlišnými vlastnostmi, zejména polaritou rozpouštědel, jak je diskutováno při popisu experimentálních výsledků.

Tabulka 21: Správnost rozlišení vzorků aronie a muchovníků pomocí metod kanonické diskriminační analýzy a metody *k*-tého nejbližšího souseda

Metoda	Klasifikační kritérium			
	extrakční činidlo	druh ovoce	odrůda	rok produkce
CDA	84,72 %	100 %	70,83 %	83,33 %
K-tý soused	<i>k</i> =1	100 %	100 %	100%
	<i>k</i> =2	97,22 %	100 %	88,89 %

Toto pozorování potvrzují i hodnoty klasifikačních skóre charakterizující úspěšnost klasifikace vzorků dle zvolených kritérií (Tab. 21). Při diskriminaci experimentálně zjištěných charakteristik studovaných vzorků podle roku produkce bylo 83,33 % vzorků správně zařazeno; při diskriminaci podle druhu ovoce 100 %, podle odrůd 70,83 % a podle druhu extrakčního činidla byla klasifikace úspěšná na 84,72 %. Jako nejvýznamnější parametry pro účely diskriminace podle druhu extrakčního činidla byly identifikovány hodnoty chromacity, TEAC_{ABTS+} a TEAC_{DPPH}, ale i celkový obsah polyfenolů a parametr *L**.

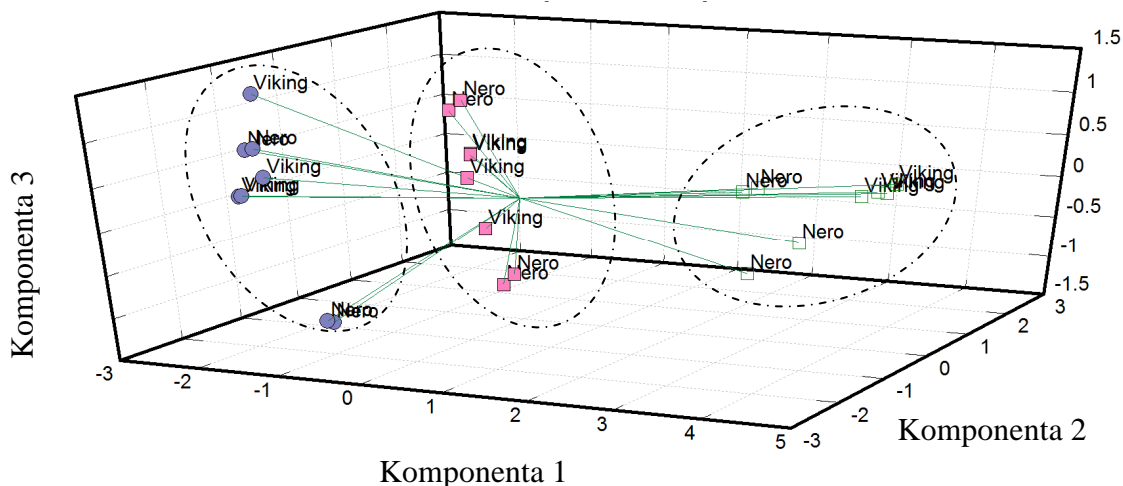
Metoda *k*-tého nejbližšího souseda rozlišila jednotlivé extrakční systémy se 100% správností pro *k*=1, pro *k*=2 správnost klasifikace klesla na 97,22 %. Klasifikace podle druhu ovoce byla realizována se 100% správností pro *k*=1 i *k*=2 a podle odrůdy se 100% správností pro *k*=1 a pro *k*=2 správnost zařazení klesla na 88,89 %.

Všechny klasifikační skóre snad s výjimkou diskriminace podle odrůdy metodou CDA poskytují velmi vysoké diskriminační a klasifikační skóre, což potvrzuje správnost použitých diskriminačních modelů pro popis vlastností jednotlivých systémů.

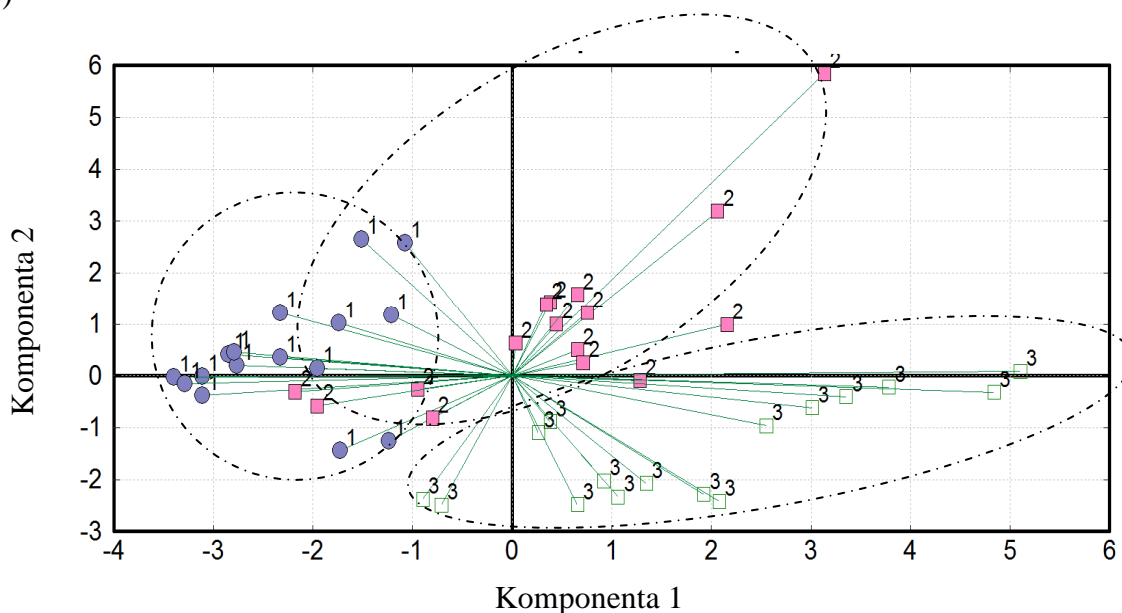
Je potřebné poznamenat, že diskriminace a klasifikace byla uskutečněna vždy pro celý soubor dat bez ohledu na druh ovoce, tj. výsledky dosažené pro odrůdy aronie i muchovníku byly posuzovány společně, což do značné míry zvyšuje vnitřní variabilitu systému a tedy i možnost nesprávné klasifikace. Z výsledků analýz všech extraktů aronie a muchovníku ale vyplývá, že i navzdory tomu, vzorky aronie a muchovníků lze velmi dobře odlišit podle použitých extrakčních činidel, druhů ovoce i jednotlivých odrůd. Pro diskriminaci vzorků mají význam hlavně barevné charakteristiky: *L**, *b** a úhel barevného odstínu.

Snížíme-li variabilitu systému tím, že uskutečníme statistickou analýzu zvlášť pro extrakty aronie a muchovníku, dosahuje se např. při klasifikaci extraktů aronie podle druhu rozpouštědla 100% úspěšnost jak metodou CDA, tak i metodou 1. a 2. nejbližšího souseda. Diferenciaci podle druhu rozpouštědla naznačují také výsledky analýzy hlavních komponent (Obr. 55a); klasifikace podle ročníku bez ohledu na rozpouštědlo vede k 91,7% správné klasifikaci. V případě analogického postupu pro odrůdy muchovníku (Obr. 55b.) však už diferenciace podle odrůd není tak jednoznačná, jelikož jsou sice dobře diferencovány extrakty v DMSO, ale extrakty ve vodě a ethanolu jsou diferencovány částečně.

a)



b)



Obr. 55: Diferenciace extraktů aronie (a) a muchovníků (b) podle rozpouštědel metodou PCA, zvlášť pro extrakty aronie a pro extrakty muchovníku za použití všech 10 experimentálně sledovaných parametrů pro konstrukci komponent. Analýza byla uskutečněna na ročník produkce. Odlišné barvy vektorů odpovídají odlišným rozpouštědlům. (1–destilovaná voda, 2–50% ethanol, 3–DMSO).

I kanonická diskriminační analýza realizovaná zvlášť pro odrůdy muchovníku prokázala 95% správnou diskriminaci vzorků podle extrakčního činidla, kdy všechny extrakty DMSO byly diskriminovány se skóre 100 %, a extrakty v ethanolu a ve vodě oba se správností 93,75 % se dvěma nesprávně klasifikovanými vzorkami ze souboru 48 klasifikovaných.

6 ZÁVĚR

Předložená diplomová práce je pilotní studií zaměřenou na komplexní charakterizaci plodů aronie a muchovníků pomocí spektroskopických a chromatografických technik s důrazem na vliv rozpouštědla na vybrané parametry. Pomocí UV-VIS-NIR spektroskopie, HPLC a EPR byly charakterizovány extrakty dvou odrůd *Aronia melanocarpa* a čtyř odrůd *Amelanchier alnifolia*, které byly sbírány v průběhu dvou let (2012, 2013) a celkově bylo sledováno 11 vybraných parametrů.

Byly testovány tři extrakční systémy: 50% ethanol, destilovaná voda a dimethylsulfoxid za účelem zjištění, které extrakční činidlo je nejvhodnější pro izolaci funkčních složek těchto plodů (hlavně polyfenolů a anthokyanů), které je možné využít jako přídatné látky v potravinářském průmyslu. Z výsledků měření lze konstatovat, že extrakční činidlo výrazně ovlivňuje koncentraci polyfenolů a anthokyanů a tím pádem barevné charakteristiky a antioxidační vlastnosti extraktů aronie a muchovníků. Nejvhodnějším rozpouštědlem se u všech parametrů z hlediska výtěžnosti jeví DMSO, které z laboratorního hlediska je vhodným rozpouštědlem pro získání maximálního množství těchto látek, ale z potravinářského hlediska je pro zavedení do technologie výroby nepoužitelné, vzhledem k jeho hořlavosti a dráždivosti. Z potravinářského hlediska jsou spíše významné výsledky v 50% ethanolu a destilované vodě, které dokazují, že tyto plody jsou výborným zdrojem polyfenolů, anthokyanů a mohou být z technologického hlediska přidávány k úpravě barvy alkoholických i nealkoholických nápojů nebo do jiných potravin za účelem zlepšení jejich kvality.

Bylo dále potvrzeno, že plody aronie mají vyšší obsah polyfenolických látek, anthokyanů a tím pádem i vyšší radikál-zhášecí aktivitu resp. antioxidační aktivitu než plody muchovníku. Co se týká zhodnocení nejlepšího vzorku u aronie z hlediska antioxidačních vlastností, není z výsledků zřejmé, který vzorek/odrůda má výrazně vyšší obsah polyfenolů, anthokyanů a tedy vyšší antioxidační vlastnosti oproti ostatním vzorkům v případě použití rozdílných extrakčních činidel. Naopak u vzorků muchovníků lze považovat odrůdu Ostravský 2012 za vzorek s nejvyšší antioxidační aktivitou a odrůdu Thiessen 2013 za vzorek s nejnižšími antioxidačními vlastnostmi, vzhledem k tomu, že ve všech extrakčních činidlech byly zaznamenány obdobné výsledky.

Z výsledků statistických analýz (analýzy ANOVA a vícerozměrných statistických metod) vyplývá, že antioxidační charakteristiky plodů aronie a muchovníku jsou ovlivňovány výběrem extrakčního činidla, environmentálními faktory (rok produkce) a druhově-odrůdovou skladbou. Z výsledků diskriminační analýzy je patrné, že mezi vzorky aronie resp. muchovníků jsou rozdíly dostatečné pro jejich úspěšnou diferenciaci a klasifikaci podle zvolených kritérií.

Tato práce shrnuje dosavadní vědecké poznatky týkající se plodů aronie a muchovníků. Podává přehledné informace o možných metodách a instrumentálních technikách, které lze na tyto plody nebo podobné potravinářské matrice aplikovat za účelem zjištění koncentrace důležitých antioxidantů. Práce je základním metodickým materiálem, ze kterého budou vycházet při navazujícím studiu ve své disertační práci, kde se budou zabývat komplexní analýzou léčivých rostlin.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] SINHA, Nirmal K a Jiwan S SIDHU. *Handbook of fruits and fruit processing*. Second edition. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 2012. ISBN 978-081-3808-949.
- [2] DOLEJŠÍ, Antonín, Vladimír KOTT a Lubomír ŠENK. *Méně známé ovoce*. 1. vyd. Praha: Brázda, 1991, s. 149
- [3] KEDZIERSKA, Magdalena, Beata OLAS, Barbara WACHOWICZ a kol. Effects of the commercial extract of aronia on oxidative stress in blood platelets isolated from breast cancer patients after the surgery and various phases of the chemotherapy. *Fitoterapia*. 2012, vol. 83, issue 2, s. 310-317. DOI: 10.1016/j.fitote.2011.11.007.
- [4] BURA, Ivan. Temnoplodec černoplodý (*Aronia melanocarpa*). In: *IFAUNA.cz* [online]. 2010 [cit. 2014-01-21]. Dostupné z: <http://www.ifauna.cz/archiv/rocnik/21/cislo/3/clanek/5122/temnoplodec-cernoplody-aronia-melanocarpa>
- [5] KULLING, Sabine a Harshadai RAWEL. Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) – A Review on the Characteristic Components and Potential Health Effects. *Planta Medica*. 2008, vol. 74, issue 13, s. 1625-1634. DOI: 10.1055/s-0028-1088306.
- [6] Aronia berries profile. HARDY, Connie. *MgMCR* [online]. 2013 [cit. 2013-11-01]. Dostupné z: http://www.agmrc.org/commodities_products/fruits/aronia-berries-profile/
- [7] SMOLIK, Milosz, Ireneusz OCHMIAN, Beata SMOLIK. RAPD and ISSR methods used for fingerprinting selected, closely related cultivars of *Aronia melanocarpa*. *Notulae botanicae horti agrobotanici cluj-napoca*. 2011, vol. 39, issue 2, s. 276-284.
- [8] SKUPIEŃ, Katarzyna a Jan OSZMIANSKI. The effect of mineral fertilization on nutritive value and biological activity of chokeberry fruit. *Agricultural and Food Science*. 2007, vol. 16, issue 1, s. 46-55. DOI: 10.2137/145960607781635822.
- [9] OVASKAINEN, Marja-Leena, Riitta TORRONEN a kol. Dietary intake and major food sources of polyphenols in Finnish adults. *Journal of nutrition*. 2008, vol. 138, issue 3, s. 562-566.
- [10] HELLSTRÖM, Jarkko K., Alexander N. SHIKOV, Marina N. MAKAROVA a kol. Blood pressure-lowering properties of chokeberry (*Aronia mitchurinii*, var. Viking). *Journal of Functional Foods*. 2010, vol. 2, issue 2, s. 163-169. DOI: 10.1016/j.jff.2010.04.004. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464610000253>
- [11] SZAEFER, Hanna, Violetta KRAJKA-KUŽNIAK a kol. Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) juice modulates 7,12-dimethylbenz[a]anthracene induced hepatic but not mammary gland phase I and II enzymes in female rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2011, vol. 31, issue 2, s. 339-346. DOI: 10.1016/j.etap.2010.12.006.
- [12] JAKOBEK, Lidija, Marijan SERUGA, Ivana NOVAK a Martina MEDVIDOVIC-KOSANOVIC. Flavonols, phenolic acids and antioxidant activity of some red fruits. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*. 2007, vol. 103, issue 8, s. 369-378.
- [13] BENVENUTI, S., F. PELLATI, M. MELEGARI a D. BERTELLI. Polyphenols, Anthocyanins, Ascorbic Acid, and Radical Scavenging Activity of Rubus, Ribes, and Aronia. *Journal of Food Science*. 2004, vol. 69, issue 3, FCT164-FCT169. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2004.tb13352.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2004.tb13352.x>
- [14] HUDEC, Jozef, Dušan BAKOŠ, Dušan MRAVEC, L'ubomír KOBIDA, Maria BURDOVÁ, Ivan TURIANICA a Jaroslav HLUŠEK. Content of Phenolic Compounds and Free Polyamines in Black Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) after Application of Polyamine Biosynthesis Regulators. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006, vol. 54, issue 10, s. 3625-3628. DOI: 10.1021/jf060299q.
- [15] OSZMIANSKI, Jan a Aneta WOJDYLO. Aronia melanocarpa phenolics and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology*. 2005, vol. 221, issue 6, s. 809-813. DOI: 10.1007/s00217-005-0002-5.
- [16] JAKOBEK, Lidija, Mato DRENJANČEVIĆ, Vladimir JUKIĆ a Marijan ŠERUGA. Phenolic acids, flavonols, anthocyanins and antiradical activity of “Nero”, “Viking”, “Galicianka” and wild chokeberries. *Scientia Horticulturae*. 2012, vol. 147, s. 56-63. DOI: 10.1016/j.scienta.2012.09.006.
- [17] KOLEČKÁŘ, Vít, Zuzana ŘEHÁKOVÁ, Eliška BROJEROVÁ a kol. Proanthocyanidiny a jejich antioxidační aktivita. *Chemické listy*. 2012, vol. 106, s. 113-121.
- [18] OPLETAL, L. a B. ŠIMERDA. Antiin vazivní látky přírodního původu jako aditiva do krmiv, Ministerstvo zemědělství ČR–Vědecký výbor pro výživu zvířat, Výzkumný ústav pro výživu zvířat, 2005, s. 27–37.
- [19] MALINOWSKA, Joanna, Wiesław OLESZEK, Anna STOCHMAL a Beata OLAS. The polyphenol-rich extracts from black chokeberry and grape seeds impair changes in the platelet adhesion and aggregation

- induced by a model of hyperhomocysteinemia. *European Journal of Nutrition*. 2013, vol. 52, issue 3, s. 1049-1057. DOI: 10.1007/s00394-012-0411-8.
- [20] DENEV, Petko, Milan ČÍŽ, Gabriela AMBROŽOVÁ a kol. Solid-phase extraction of berries anthocyanins and evaluation of their antioxidative properties. *Food Chemistry*. 2010, vol. 123, issue 4, s. 1055-1061.
- [21] JEPPSSON, Niklas, The effects of fertilizer rate on vegetative growth, yield and fruit quality, with special respect to pigments, in black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) cv. 'Viking' *Scientia Horticulturae*. 2000, vol. 83, issue 2, s. 127-137.
- [22] SLIMESTAD, Rune, Kjell TORSKANGERPOLL a kol. Flavonoids from black chokeberries, *Aronia melanocarpa*. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2005, vol. 18, issue 1, s. 61-68.
- [23] MATTILA, Pirjo, Jarkko HELLSTRÖM a Riitta TÖRRÖNEN. Phenolic Acids in Berries, Fruits, and Beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006, vol. 54, issue 19, s. 7193-7199. DOI: 10.1021/jf0615247.
- [24] KOKOTKIEWICZ, Adam, Zbigniew JAREMICZ a Maria LUCZKIEWICZ. Aronia Plants: A Review of Traditional Use, Biological Activities, and Perspectives for Modern Medicine. *Journal of Medicinal Food*. 2010, vol. 13, issue 2, s. 255-269. DOI: 10.1089/jmf.2009.0062.
- [25] GIRONÉS-VILAPLANA, Amadeo, Patrícia VALENTÃO, Paula B. ANDRADE, Federico FERRERES, Diego A. MORENO a Cristina GARCÍA-VIGUERA. Phytochemical profile of a blend of black chokeberry and lemon juice with cholinesterase inhibitory effect and antioxidant potential. *Food Chemistry*. 2012, vol. 134, issue 4, s. 2090-2096. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.04.010.
- [26] MIKULIC-PETKOVSEK, Maja, Ana SLATNAR, Franci STAMPAR a Robert VEBERIC. HPLC–MSn identification and quantification of flavonol glycosides in 28 wild and cultivated berry species. *Food Chemistry*. 2012, vol. 135, issue 4, s. 2138-2146. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.06.115.
- [27] MURRAY, Robert K. *Harperova ilustrovaná biochemie*. 5. české vyd., 1. v nakl. Galén. Překlad Bohuslav Matouš. Praha: Galén, xii, 730 s. ISBN 978-80-7262-907-7.
- [28] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin II*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, 623 s. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [29] TANAKA, Tsuneo a Akira TANAKA. Chemical components and characteristics of black chokeberry. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology-Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*. 2001, vol. 48, issue 8, s. 606-610
- [30] FRECHOVÁ, V. Stanovení aromaticky aktivních látek ve vybraných typech ovoce. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 102 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Eva Vítová, Ph.D.
- [31] KUNOVÁ, Václava. *Zdravá výživa*. 2., přeprac. vyd. Praha: Grada, 2011, 140 s. ISBN 978-80-247-3433-0.
- [32] SIMAKHINA, G., N. NAUMENKO a S. KHALAPSINA. Biological value of Aronia berries. *Ukrainian Food Journal*. 2012, vol. 1, issue 1, s. 8-11.
- [33] ZLATANOV, MD. Lipid composition of Bulgarian chokeberry, black currant and rose hip seed oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1999, vol. 79, issue 12, s. 1620-1624. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0010(199909)79:12<1620::AID-JSFA410>3.0.CO;2-G
- [34] WAWER, I., M. WOLNIAK a K. PARADOWSKA. Solid state NMR study of dietary fiber powders from aronia, bilberry, black currant and apple. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*. 2006, vol. 30, issue 2, s. 106-113. DOI: 10.1016/j.ssnmr.2006.05.001.
- [35] BORYCKA, Bożena a Jadwiga STACHOWIAK. Relations between cadmium and magnesium and aronia fractional dietary fibre. *Food Chemistry*. 2008, vol. 107, issue 1, s. 44-48. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.07.014.
- [36] SRIAMORNSAK, P. Chemistry of Pectin and Its Pharmaceutical Uses: A Review. *Silpakorn University International Journal*. 2003, vol. 1, issue 3, s. 206-228.
- [37] LIMA, M.S., E.P. PAIVA, S.A.C. ANDRADE a J.A. PAIXÃO. Fruit pectins – A suitable tool for screening gelling properties using infrared spectroscopy. *Food Hydrocolloids*. 2010, vol. 24, issue 1, s. 1-7. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2009.04.002.
- [38] PHILLIPS, G. *Handbook of Hydrocolloids (2nd Edition)*. 2nd ed. S.I., 2009. ISBN 978-184-5694-142.
- [39] RIDLEY, Brent L, Malcolm A O'NEILL a Debra MOHNEN. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*. 2001, vol. 57, issue 6, s. 929-967. DOI: 10.1016/S0031-9422(01)00113-3.
- [40] HIRVI, Timo a Erkki HONKANEN. Analysis of the volatile constituents of black chokeberry (*Aronia melanocarpa* Ell.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1985, vol. 36, issue 9, s. 808-810. DOI: 10.1002/jsfa.2740360908.
- [41] KRAUJALYTĖ, Vilma, Erich LEITNER a Petras Rimantas VENSKUTONIS. Characterization of Aronia melanocarpa Volatiles by Headspace-Solid-Phase Microextraction (HS-SPME), Simultaneous

- Distillation/Extraction (SDE), and Gas Chromatography-Olfactometry (GC-O) Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013, vol. 61, issue 20, s. 4728-4736. DOI: 10.1021/jf400152x.
- [42] KRIVORUCHKO, E. V. a V. N. KOVALEV. Essential oil from *Aronia melanocarpa* flowers. *Chemistry of Natural Compounds*. 2011, vol. 47, issue 4, s. 644-645. DOI:10.1007/s10600-011-0019-x. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10600-011-0019-x>
- [43] KIM, Bohkyung, Youngki PARK, Casey J. WEGNER, Bradley W. BOLLING a Jiyong LEE. Polyphenol-rich black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) extract regulates the expression of genes critical for intestinal cholesterol flux in Caco-2 cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2013, vol. 24, issue 9, s. 1564-1570. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2013.01.005.
- [44] WU, Xianli, Liwei GU, Ronald L. PRIOR a Steve MCKAY. 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, issue 26, s. 7846-7856. DOI: 10.1021/jf0486850.
- [45] VALCHEVA-KUZMANOVA, S., V. GADJEVA, D. IVANOVA a A. BELCHEVA. Antioxidant activity of *Aronia melanocarpa* fruit juice in vitro. *Acta Alimentaria*. 2007, vol. 36, issue 4, s. 425-428. DOI: 10.1556/AAlim.36.2007.4.5.
- [46] KOWALCZYK E., K. CHARYK, P. FIJAŁKOWSKI, J. NIEDWOROK a kol. Protective Influence of Natural Anthocyanins of *Aronia Melanocarpa* on Selected Parameters of Antioxidative Status in Experimental Intoxication with Sulphide-2-Chloroethyl-3-Chloropropyl. *Polish Journal of Environmental Studies*. 2004, vol. 13, issue 3, 339-341.
- [47] PILACYZNSKA-SYCYESNIAK L., A. SKARPANSKA-STEINBORN, E. DESKUR, P. BASTA a M. HOROSYKIEWICZ-HASSAN. The influence of chokeberry juice supplementation on the reduction of oxidative stress resulting from an incremental rowing ergometer exercise. *International Journal of Sport Nutrition & Exercise Metabolism*. 2005, vol. 15, issue 1, s. 48-58.
- [48] LALA, Geeta, Minnie MALIK, Cuiwei ZHAO, Jian HE, Youngjoo KWON, M. Monica GIUSTI a Bernadene A. MAGNUSON. Anthocyanin-Rich Extracts Inhibit Multiple Biomarkers of Colon Cancer in Rats. *Nutrition and Cancer*. 2006, vol. 54, issue 1, s. 84-93. DOI: 10.1207/s15327914nc5401_10.
- [49] SHARIF, Tanveer, Mahmoud ALHOSIN, Cyril AUGER, Carole MINKER, Jong-Hun KIM, Nelly ETIENNE-SELLOUM, Pierre BORIES, Hinrich GRONEMEYER, Annelise LOBSTEIN, Christian BRONNER, Guy FUHRMANN, Valérie B. SCHINI-KERTH a Rakesh K. SRIVASTAVA. *Aronia melanocarpa* Juice Induces a Redox-Sensitive p73-Related Caspase 3-Dependent Apoptosis in Human Leukemia Cells. *PLoS ONE*. 2012, vol. 7, issue 3, e32526-. DOI: 10.1371/journal.pone.0032526.
- [50] VALCHEVA-KUZMANOVA SV., A. BELCHEVA. Current knowledge of *Aronia melanocarpa* as a medicinal plant. *Folia Medica*. vol. 48, issue 2, s. 7-11.
- [51] KOWALCZYK E., A. KOPFF, P. FIJAŁKOWSKI, M. KOPFF, J. NIEDWOROK, J. BŁASZCZYK, J. KEDZIORA a P. TYŚLEROWICZ. Effect of anthocyanins on selected biochemical parameters in rats exposed to cadmium. *Acta Biochimica Polonica*. 2003, vol. 50, issue 2, s. 543-548.
- [52] VALCHEVA-KUZMANOVA, S., P. BORISOVA, B. GALUNSKA, I. KRASNALIEV a A. BELCHEVA. Hepatoprotective effect of the natural fruit juice from *Aronia melanocarpa* on carbon tetrachloride-induced acute liver damage in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2004, vol. 56, issue 3, s. 195-201. DOI: 10.1016/j.etp.2004.04.012.
- [53] LUZAK, Bogusława, Jacek GOLANSKI, Marek ROZALSKI, Urszula KRAJEWSKA, Beata OLAS a Cezary WATALA. Basic research Extract from *Aronia melanocarpa* fruits potentiates the inhibition of platelet aggregation in the presence of endothelial cells. *Archives of Medical Science*. 2010, vol. 2, s. 141-144. DOI: 10.5114/aoms.2010.13884.
- [54] OLAS, Beata, Barbara WACHOWICZ, Anna TOMCZAK, Joachim ERLER, Anna STOCHMAL a Wiesław OLESZEK. Comparative anti-platelet and antioxidant properties of polyphenol-rich extracts from: berries of *Aronia melanocarpa*, seeds of grape and bark of *Yucca schidigera* in vitro. *Platelets*. 2008, vol. 19, issue 1, s. 70-77. DOI: 10.1080/09537100701708506.
- [55] ZIELIŃSKA-PRZYJEMSKA Małgorzata, Anna OLEJNIK, Agnieszka DOBROWOLSKA-ZACHWIEJA a Grajek WŁODZIMIERZ. Effects of *Aronia Melanocarpa* polyphenols on oxidative metabolism and apoptosis of neutrophils from obese and non/obese individuals. *Acta Scientiarum Polonorum*. 2007, vol. 6, issue 3, s. 75-87.
- [56] Aronia Original. [online]. [cit. 2013-11-02]. Dostupné z: <http://www.aronia-original.de/aroniaproducts.html>
- [57] Olma. [online]. [cit. 2013-11-02]. Dostupné z: http://www.olma.cz/jogurty-florian-active-ochuceny-145-g-d_1_5.html
- [58] Aronia Cosmetics. [online]. [cit. 2013-11-02]. Dostupné z: <http://www.aronia-cosmetics.de/en/aronia-naturkosmetik/>

- [59] FRALISH, James S a Scott B FRANKLIN. Taxonomy and ecology of woody plants in North American forests (excluding Mexico and subtropical Florida). New York: Wiley, 2002, 612 p. ISBN 04-711-6158-6.
- [60] CAMPBELL, Christopher S. a Wesley A. WRIGHT. Apomixis, hybridization, and taxonomic complexity in eastern north American Amelanchier (Rosaceae). *Folia Geobotanica*. 1996, vol. 31, issue 3, s. 345-354. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/bf02815379>.
- [61] LEPŠÍ, Petr a Martin LEPŠÍ. Adventivní výskyt muchovníků (Amelanchier) v České republice. [online]. 2007, č. 42 [cit. 2014-01-19]. Dostupné z: <http://www.muzeumcb.cz/dokumenty/lepsi-1.pdf>
- [62] Garten.cz. [online]. 2007 [cit. 2014-01-19]. Dostupné z: <http://www.garten.cz/a/cz/2764-amelanchier-alnifolia-muchovnik-olsolisty/>
- [63] LAVOLA, Anu, Reijo KARJALAINEN a Riitta JULKUNEN-TIITTO. Bioactive Polyphenols in Leaves, Stems, and Berries of Saskatoon (Amelanchier alnifolia Nutt.) Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012, vol. 60, issue 4, s. 1020-1027. DOI: 10.1021/jf204056s.
- [64] JURÍKOVÁ, Tunde, Stefan BALLA, Jiri SOCHOR, Miroslav POHANKA, Jiri MLCEK a Mojmir BARON. Flavonoid Profile of Saskatoon Berries (Amelanchier alnifolia Nutt.) and Their Health Promoting Effects. *Molecules*. 2013, vol. 18, issue 10, s. 12571-12586. DOI: 10.3390/molecules181012571. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf204056s>
- [65] BAKOWSKA-BARCZAK, Anna M., Andreas SCHIEBER a Paul KOŁODZIEJCZYK. Characterization of Saskatoon Berry (Amelanchier alnifolia Nutt.) Seed Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009, vol. 57, issue 12, s. 5401-5406. DOI: 10.1021/jf9006278.
- [66] JURIKOVA, Tunde, Jiri SOCHOR, Otakar ROP, Jiří MLČEK, Štefan BALLA, Ladislav SZEKERES, Rastislav ŽITNÝ, Ondrej ZITKA, Vojtech ADAM a Rene KIZEK. Evaluation of Polyphenolic Profile and Nutritional Value of Non-Traditional Fruit Species in the Czech Republic — A Comparative Study. *Molecules*. 2012, vol. 17, issue 12, s. 8968-8981. DOI: 10.3390/molecules17088968.
- [67] ROP, Otakar. Vojtěch ŘEZNÍČEK et al. Nutritional values of new Czech cultivars of Saskatoon berries (Amelanchier alnifolia Nutt.). 2012, vol. 39, issue 3.
- [68] RITZ, John. *Application to demonstrate Substantial Equivalence between Saskatoon Berry (Amelanchier alnifolia) and Blueberry (Vaccinium)*. 2004.
- [69] ROP, Otakar, Jiri MLCEK, Tunde JURIKOVA, Jiri SOCHOR a Rene KIZEK. Antioxidant properties of saskatoon berry (Amelanchier alnifolia Nutt.) fruits. *Fruits*. 2013, vol. 68, issue 5, s. 435-444. DOI: 10.1051/fruits/2013087.
- [70] OZGA, Jocelyn A., Asma SAEED, Wendy WISMER a Dennis M. REINECKE. Characterization of Cyanidin- and Quercetin-Derived Flavonoids and Other Phenolics in Mature Saskatoon Fruits (Amelanchier alnifolia Nutt.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, vol. 55, issue 25, s. 10414-10424. DOI: 10.1021/jf072949b.
- [71] HU, C., B.H.L. KWOK a D.D KITTS. Saskatoon berries (Amelanchier alnifolia Nutt.) scavenge free radicals and inhibit intracellular oxidation. *Food Research International*. 2005, vol. 38, 8-9, s. 1079-1085. DOI: 10.1016/j.foodres.2005.02.024.
- [72] MAZZA, G. a C.G. DAVIDSON. Saskatoon berry: A fruit crop for the prairies. *New crops*. Wiley, New York 1993, p. 516-519.
- [73] MAZZA, G. a T. COTTRELL. Carotenoids and cyanogenic glucosides in saskatoon berries (Amelanchier alnifolia Nutt.). *Journal of Food Composition and Analysis*. 2008, vol. 21, issue 3, s. 249-254. DOI: 10.1016/j.jfca.2007.11.003.
- [74] TATSUMA, Tetsu, Koichiro TANI, Takashi OGAWA a Noboru OYAMA. Interference-based amygdalin sensor with emulsin and peroxidase. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 1998, vol. 49, issue 3, s. 268-272. DOI: 10.1016/S0925-4005(98)00150-6.
- [75] ZHANG, Albert J., Agnes M. RIMANDO, Wilbert FISH, Srinivasa R. MENTREDDY a Suresh T. MATHEWS. Serviceberry [Amelanchier alnifolia (Nutt.) Nutt. ex. M. Roem (Rosaceae)] leaf extract inhibits mammalian α -glucosidase activity and suppresses postprandial glycemic response in a mouse model of diet-induced obesity and hyperglycemia. *Journal of Ethnopharmacology*. 2012, vol. 143, issue 2, s. 481-487. DOI: 10.1016/j.jep.2012.06.054.
- [76] BURNS KRAFT, Tristan F., Moul DEY, Randy B. ROGERS, David M. RIBNICKY, David M. GIPP, William T. CEFALU, Ilya RASKIN a Mary Ann LILA. Phytochemical Composition and Metabolic Performance-Enhancing Activity of Dietary Berries Traditionally Used by Native North Americans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008, vol. 56, issue 3, s. 654-660. DOI: 10.1021/jf071999d.
- [77] ŠERÁ Martina, Nové genotypy muchovníku (Amelanchier alnifolia) a perspektivy jejich potravinářského využití v podmínkách ČR. Zlín, 2010, 66 s. Diplomová práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
- [78] Saskatoon berry. com. [online]. 2009 [cit. 2014-01-21]. Dostupné z: <http://www.saskatoonberry.com/products.html>
- [79] Prairie berries. [online]. 2008 [cit. 2014-01-21]. Dostupné z: <http://www.prairieberries.com/products.php>

- [80] IGNAT, Ioana, Irina VOLF a Valentin I. POPA. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*. 2011, vol. 126, issue 4, s. 1821-1835. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.12.026.
- [81] ROGINSKY, V a E LISSI. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*. 2005, vol. 92, issue 2, s. 235-254. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.08.004.
- [82] Burns, D. A. - Ciuzczak, E. W.: Handbook of near-infrared analysis. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press INC., 2008, 808 p. ISBN 084937393X.
- [83] MUSELÍK, Jan. Aplikace blízké infračervené spektroskopie ve farmaceutické analýze. *Chemické listy*. 2012, vol. 106, s. 10-15.
- [84] ANDERSON, Rosaleen J, David J BENDELL a Paul W GROUNDWATER. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2004, 176 p. ISBN 08-540-4476-0.
- [85] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-863-6907-2.
- [86] JAKOBEK et al. Antioxidant activity and polyphenols of Aronia in comparison to other berry species. *Agriculturae Conspectus Scientificus*. 2007, vol. 72, issue 4.
- [87] BAKOWSKA-BARCZAK, Anna M. a Paul KOŁODZIEJCZYK. Evaluation of Saskatoon Berry (*Amelanchier alnifolia* Nutt.) Cultivars for their Polyphenol Content, Antioxidant Properties, and Storage Stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008, vol. 56, issue 21, s. 9933-9940. DOI: 10.1021/jf801887w.
- [88] ŠTAVÍKOVÁ, L. Charakterizace vlastností extraktů z hroznových bobulí pomocí moderních analytických metod. Brno, 2010, 109 s. Disertační práce na Fakultě chemické Vysokého učení technického v Brně. Vedoucí práce Doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
- [89] CORRALES, M., S. TOEPFL, P. BUTZ, D. KNORR a B. TAUSCHER. Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison. *Innovative Food Science*. 2008, vol. 9, issue 1, s. 85-91. DOI: 10.1016/j.ifset.2007.06.002.
- [90] PUÉRTOLAS, Eduardo, Oliver CREGENZÁN, Elisa LUENGO, Ignacio ÁLVAREZ a Javier RASO. Pulsed-electric-field-assisted extraction of anthocyanins from purple-fleshed potato. *Food Chemistry*. 2013, vol. 136, 3-4, s. 1330-1336. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.09.080.
- [91] CASTAÑEDA-OVANDO, Araceli, Ma. de Lourdes PACHECO-HERNÁNDEZ, Ma. Elena PÁEZ-HERNÁNDEZ, José A. RODRÍGUEZ a Carlos Andrés GALÁN-VIDAL. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*. 2009, vol. 113, issue 4, s. 859-871. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.09.001.
- [92] KHODDAMI, Ali, Meredith WILKES a Thomas ROBERTS. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules*. 2013, vol. 18, issue 3, s. 2328-2375. DOI: 10.3390/molecules18022328.
- [93] FREITAS, Adilson A., K. SHIMIZU, Luís G. DIAS a Frank H. QUINA. A computational study of substituted flavylum salts and their quinonoidal conjugate-bases: S0 -> S1 electronic transition, absolute pKa and reduction potential calculations by DFT and semiempirical methods. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2007, vol. 18, issue 8, s. 1537-1546. DOI: 10.1590/S0103-50532007000800014.
- [94] BÉLANGER, Jacqueline M.R., J.R. JOCELYN PARÉ a Michel SIGOUIN. Chapter 2 High performance liquid chromatography (HPLC): Principles and applications. s. 37. DOI: 10.1016/S0167-9244(97)80011-X.
- [95] MOLDOVEANU, Șerban a Victor DAVID. *Essentials in modern HPLC separations*. Waltham, MA: Elsevier, 2013, 532 p. ISBN 978-012-3850-133
- [96] DOUGLAS A. SKOOG, Douglas A. Donald M. *Fundamentals of analytical chemistry* [online]. 9th edition. 2013 [cit. 2013-11-02]. ISBN 04-955-5828-1. Dostupné z: http://www.ebook3000.com/Fundamentals-of-Analytical-Chemistry--9th-edition_198692.html
- [97] STÖRMANN, Reinhold. Liquid Chromatography. *www.uft.uni-bremen.de: UFT Bioorganische Chemie* [online]. 2003 [cit. 2014-02-16]. Dostupné z: <http://chem.uft.uni-bremen.de/Chromatography/chrom065.htm>
- [98] LEE, Jungmin, Christopher RENNAKER a Ronald E. WROLSTAD. Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry*. 2008, vol. 110, issue 3, s. 782-786. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.03.010. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030881460800304X>
- [99] WELCH, Cara, Qingli WU a James SIMON. Recent Advances in Anthocyanin Analysis and Characterization. *Current Analytical Chemistry*. 2008-04-01, vol. 4, issue 2, s. 75-101. DOI: 10.2174/157341108784587795.
- [100] ALAM, Md. Nur, Nusrat Jahan BRISTI a Md. RAFIQUZZAMAN. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2013, vol. 21, issue 2, s. 143-152. DOI: 10.1016/j.jsps.2012.05.002.

- [101] OCHMIAN Ireneusz, Jan OSZMIANŃSKI a Katarzyna SKUPIE Chemical composition, phenolics, and firmness of small black fruits. *Journal of Applied botany and Food Quality*. 2009, vol. 83, issue 1, p. 64-69.
- [102] ŠTĚPÁNKOVÁ, Eva. Barva, její definice a barvové prostory. In: *Chempoint.cz* [online]. 2011 [cit. 2014-02-15]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/barva-jeji-definice-a-barvove-prostory>
- [103] ŠULCOVÁ, Petra. *Vlastnosti anorganických pigmentů a metody jejich hodnocení*. 2008, Vyd. 2. Pardubice: Univerzita Pardubice, 94 s. ISBN 978-80-7395-057-6.
- [104] REMION. Labo.cz. *Laboratorní průvodce* [online]. 2013 [cit. 2014-02-16]. Dostupné z: http://www.labo.cz/mft/rad_pasma.htm
- [105] KALČICOVÁ, Andrea. Barevné modely. In: web.vscht.cz [online]. 2010 [cit. 2014-02-15]. Dostupné z: http://web.vscht.cz/~kalcicoa/POCPRE/o_webu.html
- [106] KNESS, Mark. ColorPy - A Python package for handling physical descriptions of color and light spectra. In: <http://markkness.net> [online]. 2008 [cit. 2014-02-16]. Dostupné z: <http://markkness.net/colorpy/ColorPy.html>
- [107] SCHANDA, János. *Colorimetry: understanding the CIE system*. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, 2007, 459 p. ISBN 04-700-4904-9.
- [108] MARTINKOVÁ Zuzana. Stanovení vitamínu C po tepelné úpravě, 2010, 141 s. Diplomová práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.
- [109] NOVÁKOVÁ, L., P. SOLICH a D. SOLICHOVÁ. HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2008, vol. 27, issue 10, s. 942-958. DOI: 10.1016/j.trac.2008.08.006.
- [110] KLIMCZAK, Inga, Maria MAŁECKA, Mirosława SZLACHTA a Anna GLISZCZYŃSKA-ŚWIGŁO. Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2007, vol. 20, 3-4, s. 313-322. DOI: 10.1016/j.jfca.2006.02.012.
- [111] CETKOVSKÁ Jitka. Stanovení vitamínu C kapalinovou chromatografií v plodech jednotlivých odrůd méně známých druhů ovoce. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2009, s. 87
- [112] PAULOVÁ, Hana, Hana BOCHOŘÁKOVÁ a Eva TÁBORSKÁ Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické listy*. 2004, vol. 98, s. 113-121.
- [113] KEDARE, Sagar B. a R. P. SINGH. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*. 2011, vol. 48, issue 4, s. 412-422. DOI: 10.1007/s13197-011-0251-1. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13197-011-0251-1>
- [114] PRIOR, Ronald L., Xianli WU a Karen SCHAICH. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, vol. 53, issue 10, s. 4290-4302. DOI: 10.1021/jf0502698.
- [115] REBELO, M.J., R. REGO, M. FERREIRA a M.C. OLIVEIRA. Comparative study of the antioxidant capacity and polyphenol content of Douro wines by chemical and electrochemical methods. *Food Chemistry*. 2013, vol. 141, issue 1, s. 566-573. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.02.120.
- [116] OSMAN, A.M., K.K.Y. WONG a A. FERNYHOUGH. ABTS radical-driven oxidation of polyphenols: Isolation and structural elucidation of covalent adducts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006, vol. 346, issue 1, s. 321-329. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.05.118.
- [117] LACHMAN, Jaromír, Miloslav ŠULC a Marek SCHILLA. Comparison of the total antioxidant status of Bohemian wines during the wine-making process. *Food Chemistry*. 2007, vol. 103, issue 3, s. 802-807. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.09.024.
- [118] NADEEM, Muhammad Asghar, Khan Islam ULLAH, Muhammad NADEEM a kol. Evaluation of antioxidant activity using an improved DMPD radical cation decolorization assay. *Acta Chimica Slovenica*. 2007, vol. 54, issue 2, s. 295-300.
- [119] LAURA A. DE LA ROSA, Laura A. Emilio Alvarez-Parrilla. *Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry, nutritional value and stability*. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 2010, 384 s. ISBN 08-138-0320-9.
- [120] WILCOX, C. S. a A. PEARLMAN. Chemistry and Antihypertensive Effects of Tempol and Other Nitroxides. *Pharmacological Reviews*. 2008-12-01, vol. 60, issue 4, s. 418-469. DOI: 10.1124/pr.108.000240.
- [121] WILCOX, Christopher S. Effects of tempol and redox-cycling nitroxides in models of oxidative stress. *Pharmacology*. 2010, vol. 126, issue 2, s. 119-145. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2010.01.003.
- [122] KUDO, Wataru, Mayumi YAMATO, Ken-Ichi YAMADA, Yuichi KINOSHITA, Takeshi SHIBA, Toshiaki WATANABE a Hideo UTSUMI. Formation of TEMPOL-hydroxylamine during reaction between TEMPOL and hydroxyl radical: HPLC/ECD study. *Free Radical Research*. 2008, vol. 42, issue 5, s. 505-512. DOI: 10.1080/10715760802112809.

- [123] CHATGILIALOGLU, Chryssostomos a Armido STUDER. *Encyclopedia of radicals in chemistry, biology, and materials*. Hoboken, N.J.: John Wiley, 2012, 2324 s. ISBN 978-047-0971-253.
- [124] LI, Lei, C.-Y. Oliver CHEN, Hye-Kyung CHUN, Soo-Muk CHO, Ki-Moon PARK, Yang Cha LEE-KIM, Jeffrey B. BLUMBERG, Robert M. RUSSELL a Kyung-Jin YEUM. A fluorometric assay to determine antioxidant activity of both hydrophilic and lipophilic components in plant foods. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2009, vol. 20, issue 3, s. 219-226. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2008.02.006.
- [125] PRIOR, Ronald L., Ha HOANG, Liwei GU, Xianli WU, Mara BACCHIOCCA, Luke HOWARD, Maureen HAMPSCH-WOODILL, Dejian HUANG, Boxin OU a Robert JACOB. Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC FL)) of Plasma and Other Biological and Food Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003, vol. 51, issue 11, s. 3273-3279. DOI: 10.1021/jf0262256.
- [126] GADELLA, T. *FRET and FLIM techniques: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. 1st ed. Boston: Elsevier, 2009, 534 s. ISBN 00-805-4958-6.
- [127] WEIL, John A a James R BOLTON. *Electron paramagnetic resonance: elementary theory and practical applications*. 2nd ed. Hoboken: John Wiley, 2007, 687 s. ISBN 978-0-471-75496-1.
- [128] BRUSTOLON, Marina a Giacomo GIAMELLO. *Electron paramagnetic resonance: a practitioner's toolkit*. Hoboken, 1st ed. New Jersey.: Wiley, 2009, 553 s. ISBN 04-702-5882-9.
- [129] GERSON, Fabian. *Electron spin resonance spectroscopy of organic radicals*. 1st ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2003, 464 s. ISBN 35-273-0275-1.
- [130] GONZÁLEZ, Paula Mariela, María Belén AGUIAR, Gabriela MALANGA a Susana PUNTARULO. Electronic paramagnetic resonance (EPR) for the study of ascorbyl radical and lipid radicals in marine organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular*. 2013, vol. 165, issue 4, s. 439-447. DOI: 10.1016/j.cbpa.2013.02.021.
- [131] EATON, Gareth R, Sandra S EATON, David P BARR a Ralph Thomas WEBER. *Quantitative EPR*. New York: Springer, 2010, 185 s. ISBN 32-119-2947-9.
- [132] BERLINER, Lawrence J, Valery KHRAMTSOV, Hirotsada FUJII a Thomas L CLANTON. Unique in vivo applications of spin traps. *Free Radical Biology and Medicine*. 2001, vol. 30, issue 5, s. 489-499. DOI: 10.1016/S0891-5849(00)00491-3.
- [133] ROSEN, Gerald M. *Free radicals: biology and detection by spin trapping*. New York: Oxford University Press, 1999, 482 s. ISBN 01-950-9505-7.
- [134] HAWKINS, C. L. a M. J. DAVIES. Detection and characterisation of radicals in biological materials using EPR methology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2013, vol. Article in Press
- [135] FAURE, Audrey M., Mogens L. ANDERSEN a Laura NYSTRÖM. Ascorbic acid induced degradation of beta-glucan: Hydroxyl radicals as intermediates studied by spin trapping and electron spin resonance spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*. 2012, vol. 87, issue 3, s. 2160-2168. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.10.045.
- [136] VALCHEVA-KUZMANOVA, Stefka, Sreko VALI. Electron spin resonance measurement of radical scavenging activity of Aronia melanocarpa fruit juice. *Pharmacognosy Magazine*. 2012, vol. 8, issue 30, s. 171-. DOI: 10.4103/0973-1296.96583. Dostupné z: <http://www.phcog.com/text.asp?2012/8/30/171/96583>
- [137] OLNICKÝ, Jan. *Využití analýzy hlavních komponent (PCA) ke zpracování obrazových dat: Image data processing using principal component analysis (PCA)*. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2008.
- [138] MATSUNAGA, Masaki. How to factor-analyze your data right: Do's, Don'ts, and How-to's. *International Journal of Psychological Research*. 2010, vol. 3, issue 1, p. 97-110.
- [139] *Unistat Statistics Software* [online]. 2013 [cit. 2014-04-14]. Dostupné z: <http://www.unistat.com/guide/multivariate-analysis/>
- [140] BROTAN, Jan, Miroslav TRNKA, Petr HLAVINKA, Daniela SEMERÁDOVÁ a Zdeněk ŽALUD. *Klimatické a agroklimatické podmínky Žabčic v období 1961-2010: monografie*. Vyd. 1. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2013, 52 s. Folia Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis. ISBN 978-80-7375-907-0.
- [141] ROGIERS, Suzy Y. a N. Richard KNOWLES. Physical and chemical changes during growth, maturation, and ripening of saskatoon (*Amelanchier alnifolia*) fruit. *Canadian Journal of Botany*. 1997, vol. 75, issue 8, s. 1215-1225. DOI: 10.1139/b97-835.
- [142] CHAOVANALIKIT, A. a R. E. WROLSTAD. Total Anthocyanins and Total Phenolics of Fresh and Processed Cherries and Their Antioxidant Properties. *Journal of Food Science*. 2004, vol. 69, issue 1. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb17858>.
- [143] GIUSTI, M. Monica a Ronald E. WROLSTAD. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley, 2001. DOI: 10.1002/0471142913.faf0102s00.

- [144] CHYAU, Charng-Cherng, Shu-Yao TSAI, Pei-Tzu KO a Jeng-Leun MAU. Antioxidant properties of solvent extracts from Terminalia catappa leaves. *Food Chemistry*. 2002, vol. 78, issue 4, s. 483-488. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0308-8146\(02\)00162-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0308-8146(02)00162-0).
- [145] TOBOLKOVÁ, B.; DUREC, J.; BELAJOVÁ, E.; MIHALÍKOVÁ, M.; POLOVKA, M.; SUHAJ, M.; DAŠKO, L.; ŠÍMKO, P. Effect of light conditions on physico- chemical properties of pineapple juice with addition of small pineapple pieces during storage. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2013, roč. 52, č. 3, s. 181-190. ISSN: 1336- 8672.
- [146] RE, Roberta, Nicoletta PELLEGRINI, Anna PROTEGGENTE, Ananth PANNALA, Min YANG a Catherine RICE-EVANS. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999, vol. 26, 9-10. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3).
- [147] ŠMEJKALOVÁ, Daniela, Martina HERMANNOVÁ, Romana ŠULÁKOVÁ, Alena PRŮŠOVÁ, Jiří KUČERÍK a Vladimír VELEBNÝ. Structural and conformational differences of acylated hyaluronan modified in protic and aprotic solvent system. *Carbohydrate Polymers*. 2012, vol. 87, issue 2. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.09.057.
- [148] HUNGER, Johannes, Richard BUCHNER, Mohamed E. KANDIL, Eric F. MAY, Kenneth N. MARSH a HEFTER. Relative Permittivity of Dimethylsulfoxide and N, N -Dimethylformamide at Temperatures from (278 to 328) K and Pressures from (0.1 to 5) MPa †. *Journal of Chemical*. 2010-05-13, vol. 55, issue 5, s. 2055-2065. DOI: 10.1021/je9010773.
- [149] *USDA National Nutrient Database* [online]. 2011[cit. 2014-03-28]. Dostupné z: <http://ndb.nal.usda.gov/>
- [150] AMORATI, Riccardo, Stefano MENICHETTI, Caterina VIGLIANISI a Mario C. FOTI. Proton–electron transfer pathways in the reactions of peroxy and dpph' radicals with hydrogen-bonded phenols. *Chemical Communications*. 2012, vol. 48, issue 97, s. 11904-. DOI: 10.1039/c2cc36531f.
- [151] MARINOVA, G. a V. BATCHVAROV. Evaluation of the methods for determination of the free radical scavenging activity by DPPH. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 2011, vol. 17, issue 1, s. 11-24

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA	ascorbic acid (askorbová kyselina)
AAPH	(2,2'-azobis(-(2-amidinopropan-dihydrochlorid))
ABTS	(2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzthiazol)-6-sulfonát
AMVN	(2,2'-azobis-2,4-dimethylvaleronitril)
ANOVA	Analysis of Variance
CDA	Canonical Discrimination Analysis
CIE	barevný model CIE (Commission Internationale de l'Eclairage) 1931
CIE L*a*b*	barevný model CIE 1976 L*a*b*
CIE L*u*v*	barevný model CIE 1976 L*u*v*
CMYK	barevný model založený na subtraktivním míchání barev
CUPRAC	Cupric ion reducing antioxidant capacity
DAD	Diode Array Detector (detektor s diodovým polem)
DHAA	dehydroascorbic acid (dehydroaskorbová kyselina)
DMPD	N,N-dimethyl-p-fenylendiamin
DMPO	5,5-dimethyl-1-pyrolin-N-oxid
DMSO	dimethylsulfoxid
DPPH	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl
EC ₅₀	koncentrace substrátu, která způsobuje 50% pokles absorbance
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EPR	Electron Paramagnetic Resonance (Elektronová paramagnetická rezonance)
FC	Folin-Ciocalteuovo
FRAP	Ferric reducing antioxidant potential
GAE	Gallic Acid Equivalent (ekvivalent gallové kyseliny)
GC	Gas Chromatography (plynová chromatografie)
HDL	High density lipoprotein (lipoprotein s vysokou hustotou)
HLS	barevný model zavedený firmou Tektronix
H-ORAC	Hydrophilic Oxygen radical absorbing capacity
HPLC	High performance liquid chromatography (vysokoučinná kapalinová chromatografie)
HSB	Hue, Saturation, Brightness, barevný model
HSV	Hue, Saturation, Value, barevný model
LDL	Low density lipoprotein (lipoprotein s nízkou hustotou)
L-ORAC	Lipophilic Oxygen radical absorbing capacity
NA	neanalyzováno
NCS	Natural Color Systém, barevný model
ND	nedetekováno
NMR	Nuclear magnetic resonance (nukleární magnetická rezonance)
NP-HPLC	Normal Phase High performance liquid chromatography
ORAC	Oxygen radical absorbing capacity
PBN	α-fenyl-N-terc-butyl-nitron
PC	Polyphenolic compounds (polyfenolické sloučeniny)
PCA	Principal Component Analysis
PCF	Principal Component Factoring
PCY	Procyanidins (prokyanidiny)
POBN	α-(4-pyridyl-1-oxid)-N-terc-butyl-nitronu
PROXYL	3-karbamoyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-N-oxyl
RGB	Red Green Blue, barevný model

RP-HPLC	Reverse Phase High performace liquid chromatography
TAA	Total Antioxidant Activity (celková antioxidační aktivita)
TAC	Total Anthocyanins Content (celkový obsah anthokyanů)
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
TCEP	tris(2-karboxyethyl)fosfinu
TE	Trolox ekvivalent (ekvivalent Troloxu)
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity
TEMPO	2,2,6,6-tetramethylpiperidinyl-N-oxyl
TEMPOL	(4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl)
TPC	Total Polyphenolic Content
TPTZ	2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazin)
UV-VIS	Ultraviolet Visible Spectroscopy
UV-VIS-NIR	Ultraviolet-Visible-Near Infrared Spectroscopy
YUV	barevný model používaný v televizním vysílání v normě PAL i HDTV

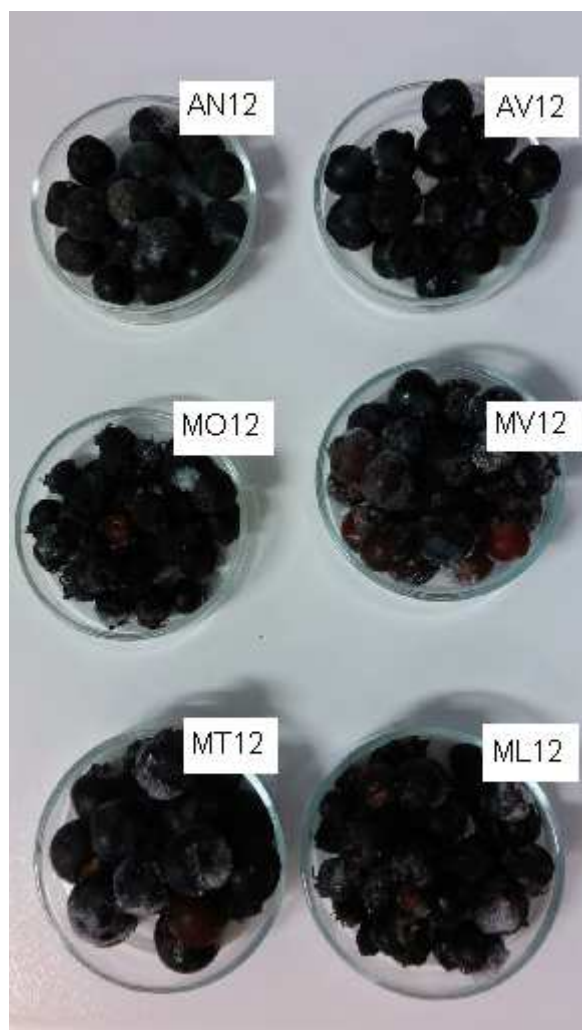
9 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Přehled analyzovaných odrůd aronie a muchovníků rok 2012

Příloha 2: Přehled analyzovaných odrůd aronie a muchovníků rok 2013

10 PŘÍLOHY

Příloha 1: Přehled analyzovaných odrůd aronie a muchovníků rok 2012



Pozn.:

AN12 – *Aronia melanocarpa* odrůda Nero, rok 2012

AV12 – *Aronia melanocarpa* odrůda Viking, rok 2012

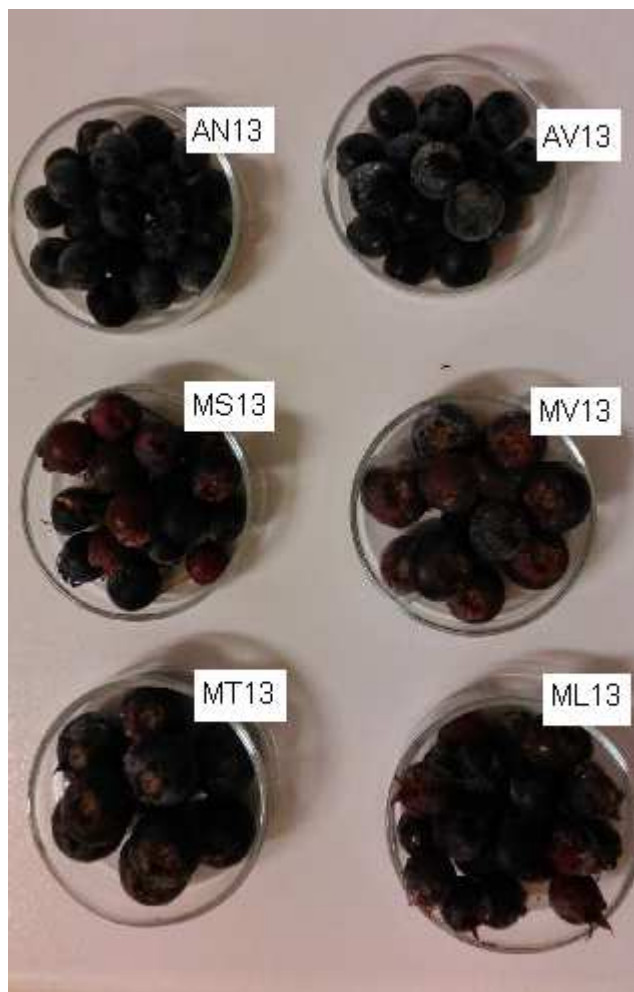
MO12 – *Amelanchier alnifolia* odrůda Ostravský, rok 2012

MV12 – *Amelanchier alnifolia* odrůda Tišnovský velkoplodý, rok 2012

MT12 – *Amelanchier alnifolia* odrůda Thiessen, rok 2012

ML12 – *Amelanchier alnifolia* odrůda Lamarckii Balerina, rok 2012

Příloha 2: Přehled analyzovaných odrůd aronie a muchovníků rok 2013



Pozn.:

AN13 – *Aronia melanocarpa* odrůda Nero, rok 2013

AV13 – *Aronia melanocarpa* odrůda Viking, rok 2013

MS13 – *Amelanchier alnifolia* odrůda Tišnovský školský, rok 2013

MV13 – *Amelanchier alnifolia* odrůda Tišnovský velkoplodý, rok 2013

MT13 – *Amelanchier alnifolia* odrůda Thiessen, rok 2013

ML13 – *Amelanchier alnifolia* odrůda Lamarckii Balerina, rok 2013